

**TRANSPORT TRANSMEMBRANAIRE ET AUTO-ASSEMBLAGE  
IMPLIQUANT DES PEPTIDES SYNTHÉTIQUES MODIFIÉS**

par

Jean-Christophe Meillon

thèse présentée au Département de Chimie  
en vue de l'obtention du doctorat ès sciences (Ph. D.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, juin 1998



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-40527-3

**IDENTIFICATION DES MEMBRES DU JURY**

**THESE DE DOCTORAT  
DE  
MONSIEUR JEAN-CHRISTOPHE MEILLON**

**PRESIDENT-RAPPORTEUR**

**LUC RUEST**

**MEMBRE**

**CLAUDE SPINO**

**MEMBRE**

**NORMAND VOYER**

**MEMBRE EXTERNE**

**JAMES D. WUEST**

**A SHERBROOKE  
CE 5 JUIN 1998**

*« Nous avons traversé des continents, des océans sans fin, sur des radeaux tressés de rêves. Et nous voici devant, vivants... »*

Richard Desjardins.

À la mémoire de mon grand-père.



## SOMMAIRE

Cette thèse décrit l'utilisation, à deux fins différentes, d'un même type de peptides synthétiques modifiés par des éthers-couronne.

Dans sa première partie, nous présentons la conception, la synthèse et l'étude d'activité d'une classe de canaux ioniques artificiels. Le premier chapitre est consacré à la conception et à l'approche synthétique des composés cible. Le deuxième chapitre est réservé aux études conformationnelles des molécules préparées, par deux techniques spectroscopiques. Nous terminons, dans le troisième chapitre, en étudiant l'activité de nos polypeptides et en proposant un modèle d'activité, compatible avec le mode d'action de certains canaux ioniques, naturels ou artificiels, précédemment décrits.

La deuxième partie rapporte la conception et la préparation de pseudorotaxanes peptidiques. Ce projet est fondé sur des phénomènes d'auto-assemblage impliquant des polyammoniums secondaires polybenzyliques et des éthers-couronne greffés sur des peptides. La synthèse et la caractérisation des hôtes et des invités sont décrites dans le premier chapitre, tandis que le deuxième dépeint la préparation puis, la caractérisation des complexes par spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire. Le troisième chapitre est consacré aux études conformationnelles des complexes par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire. Enfin, le quatrième et dernier chapitre est réservé à la mesure des constantes d'association entre les hôtes et les invités.

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier très sincèrement le Professeur Normand Voyer pour m'avoir accueilli dans son équipe, proposé ces deux sujets si passionnants et laissé le loisir de prendre plusieurs initiatives aux cours de ces 4 années tellement stimulantes et si enrichissantes. Merci Normand. C'est.... SUPER !

De même, je remercie le professeur J. Fraser Stoddart d'avoir mis sur rails le projet des pseudorotaxanes.

Je dois souligner la précieuse collaboration de plusieurs personnes impliquées, directement ou non, dans mes projets: Patrick Van Hove (tests de cytotoxicité); le Professeur G. Andrew Woolley et Dominic Jaikaran (mesures de conductivité monomoléculaire); la Professeure Michèle Auger, Mario Bouchard et Sacha Bonenfant (mesures ATR); Normand Pothier (RMN), Gaston Boulay (spectres de masse) et les spectrométristes de masse de l'Université de Toronto; Nicolas Le Berre et Gilles Sauvé (RMN).

Je ne pourrais pas oublier le soutien de mes nombreux collègues de laboratoire. Je me dois de citer Julie Lamothe (pour toute ton aide), Johanne Roby (bye, là ! Jojo), Simon Côté (qui m'a appris que si la patente restait pognée dans'grément, on pouvait avoir du troup' en tab...) et Sophie Ubaldi (ma PMYA...) qui savent chacun la place qu'ils gardent dans mon coeur.

Enfin, rien n'aurait été possible sans le support moral et financier de mes parents et de ma famille; ni même sans celui de mes très chers amis (français, maudits français ou québécois) qui savent tout de mes talents de « squatter ».

Ceux-là n'auront aucun mal à se reconnaître.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	iii
REMERCIEMENTS .....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xi
LISTE DES TABLEAUX .....	xiv
LISTE DES FIGURES .....	xv
LISTE DES ANNEXES .....	xxi

INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
-----------------------------	---

<b>PREMIÈRE PARTIE: SYNTHÈSE, ÉTUDES CONFORMATIONNELLES ET ACTIVITÉ DE CANAUX IONIQUES ARTIFICIELS .....</b>	<b>5</b>
--	----------

INTRODUCTION .....	6
CHAPITRE 1: CONCEPTION ET SYNTHÈSE DU MODÈLE .....	23
1.1 Préambule .....	23
1.2 Conception d'un modèle de canal ionique artificiel .....	23
1.2.1 Prérequis .....	23
1.2.2 Modèle choisi .....	24
1.2.3 Aspect chimique .....	26
1.2.4 Stratégie générale de synthèse .....	27
1.3 Synthèse du modèle .....	28

1.3.1 Synthèse de la <i>N</i> -BOC-3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl-L-alanine <b>14</b> .....	28
1.3.2 Synthèse peptidique en phase solide .....	30
1.3.2.1 Préparation de la résine de Kaiser (résine oxime) .....	31
1.3.2.2 Synthèse du segment heptapeptide sur support solide .....	32
1.3.2.3 Clivage du segment - préparation de l'heptapeptide acide .....	34
1.3.2.4 Condensation des segments heptapeptide sur support solide .....	37
1.3.2.5 Clivage final du peptide .....	40
1.3.2.6 Autres composés préparés .....	41
1.4 Conclusion .....	43
CHAPITRE 2: ÉTUDES CONFORMATIONNELLES SUR LES MODÈLES .....	44
2.1 Préambule .....	44
2.2 Études conformationnelles par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire .....	44
2.2.1 La spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire .....	44
2.2.2 Études de spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire dans divers solvants .....	47
2.2.3 Études de spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire dans des bicouches lipidiques .....	50
2.3 Études conformationnelles par spectroscopie infrarouge .....	53
2.4 Conclusion .....	55

CHAPITRE 3: ÉTUDES D'ACTIVITÉ ET MÉCANISME D'ACTION DES MODÈLES .....	56
3.1 Préambule .....	56
3.2 Mesure du transport de cations par la méthode de « pH-stat » .....	56
3.3 Mesures de conductivité monomoléculaire .....	59
3.3.1 La méthode de « <i>patch clamp</i> » .....	59
3.3.2 Études de conductivité monomoléculaire sur les modèles .....	61
3.4 Études d'orientation du modèle dans les bicouches lipidiques par réflexion totale atténuée .....	64
3.4.1 La méthode de réflexion totale atténuée .....	64
3.4.2 Études sur le peptide <b>29</b> .....	66
3.5 Études d'évaluation de l'activité biologique .....	68
3.5.1 Activité bactériostatique .....	68
3.5.2 Cytotoxicité envers les cellules eucaryotes .....	69
3.6 Modèle d'activité proposé - conclusion .....	73
CONCLUSION .....	77

## **DEUXIÈME PARTIE: PRÉPARATION DE PSEUDOROTAXANES PEPTIDIQUES PAR AUTO-ASSEMBLAGE .....**

**79**

INTRODUCTION .....	80
CHAPITRE 1: CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES CONSTITUANTS ...	96
1.1 Préambule .....	96
1.2 Conception des peptides modifiés ( <i>hôtes</i> ) .....	96

1.3 Conception des polyammoniums secondaires polybenzyliques ( <i>invités</i> ) .....	99
1.4 Synthèse des peptides modifiés .....	103
1.4.1 Synthèse de la <i>N</i> -BOC-3-(dibenzo-24-couronne-8)-L- alanine <b>74</b> .....	103
1.4.2 Synthèse peptidique .....	106
1.5 Synthèse des sels de polyammoniums secondaires polybenzyliques .....	107
1.5.1 Synthèse de DA•2PF <sub>6</sub> <b>69</b> .....	107
1.5.2 Synthèse de TA•3PF <sub>6</sub> <b>70</b> .....	108
1.6 Conclusion .....	110
CHAPITRE 2: PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES COMPLEXES .....	111
2.1 Préparation des complexes .....	111
2.2 Caractérisation des complexes par spectrométrie de masse .....	114
2.3 Caractérisation des complexes par RMN <sup>1</sup> H 500 MHz .....	117
2.3.1 Complexe [ <b>63</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	117
2.3.2 Complexe [ <b>64</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	122
2.3.3 Complexes [ <b>65</b> •TA]•3PF <sub>6</sub> et [ <b>66</b> •TA]•3PF <sub>6</sub> .....	123
2.3.4 Complexe [ <b>67</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	123
2.3.5 Complexe [ <b>68</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	130
2.4 Conclusion .....	135
CHAPITRE 3: ÉTUDES CONFORMATIONNELLES PAR SPECTROPOLARIMÉTRIE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE .....	138
3.1 Préambule .....	138
3.2 Études du peptide <b>63</b> et du complexe [ <b>63</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	139

3.2.1 Étude du peptide <b>63</b> .....	139
3.2.2 Étude du complexe [ <b>63</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	142
3.3 Études du peptide <b>64</b> et du complexe [ <b>64</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	143
3.3.1 Étude du peptide <b>64</b> .....	143
3.3.2 Étude du complexe [ <b>64</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	146
3.4 Études des composés <b>65</b> , <b>66</b> , [ <b>65</b> •TA]•3PF <sub>6</sub> et [ <b>66</b> •TA]•3PF <sub>6</sub> .....	147
3.4.1 Étude des peptides <b>65</b> et <b>66</b> .....	147
3.4.2 Étude des complexes [ <b>65</b> •TA]•3PF <sub>6</sub> et [ <b>66</b> •TA]•3PF <sub>6</sub> ....	147
3.5 Études du peptide <b>67</b> et du complexe [ <b>67</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	153
3.6 Études du peptide <b>68</b> et du complexe [ <b>68</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	156
3.6.1 Étude du peptide <b>68</b> .....	156
3.6.2 Étude du complexe [ <b>68</b> •DA]•2PF <sub>6</sub> .....	159
3.7 Conclusion .....	161
CHAPITRE 4: MESURE DES CONSTANTES D'ASSOCIATION .....	163
4.1 Préambule .....	163
4.2 Mesure des constantes d'association par la méthode d'extraction des picrates .....	164
4.2.1 Description de la méthode .....	164
4.2.2 Calcul des constantes d'association .....	165
4.3 Mesure des constantes d'association impliquant les peptides-hôtes à 2 éthers-couronne .....	166
4.3.1 Objectif .....	166
4.3.2 Conditions expérimentales .....	167
4.3.3 Résultats .....	168
4.4 Conclusion .....	169
CONCLUSION .....	171

<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>173</b>
<b>PARTIE EXPÉRIMENTALE .....</b>	<b>175</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>234</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>320</b>



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<u>Abréviation</u>	<u>Nom</u>
AA	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
Ala	L-alanine
ApTS	acide para-toluènesulfonique
Ar	aryl
ARN	acide ribonucléique
ATR	réflexion totale atténuée
Bt	benzotriazole
Bu	butyl
BOC	ter-butyloxycarbonyle
COSY	<i>correlated total spectroscopy</i>
CSPS	condensation de segments en phase solide
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène
DC	dichroïsme circulaire
DCE	1,2-dichloroéthane
DCM	dichlorométhane
DIC	diisopropylcarbodiimide
DIEA	diisopropyléthylamine
DiPhy	diphytanoylglycérol phosphocholine
DL <sub>50</sub>	dose létale moyenne
DMAP	N',N'-diméthylaminopyridine

DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMPC	dimyristoylglycérol phosphocholine
DMSO	diméthylsulfoxyde
DOPA	L-3-(3,4-dihydroxyphényl)-alanine
DPPC	dipalmitoylglycérol phosphocholine
ES	<i>electrospray</i>
Et	éthyl
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FCCP	carbonyl 4-trifluorométhoxy-phénylhydrazone
FT-IR	spectroscopie infrarouge
GMO	monooléate de glycérol
HOBt	hydrate d'hydroxybenzotriazole
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
Hz	hertz
Ile	L-isoleucine
J	constante de couplage
K <sub>a</sub>	constante d'association
Leu	L-leucine
mdeg	millidegré
Me	méthyl
MeCN	acétonitrile
MeOH	méthanol
<i>m/z</i>	masse/charge
NOE	effets Overhauser nucléaires
pA	picoampère
Ph	phényl

Phé	phénylalanine
Pic	picrate
ppm	partie par million
Pr	propyl
Pro	L-proline
RMN	résonance magnétique nucléaire
Ser	L-sérine
SM	spectrométrie de masse
SPPS	synthèse peptidique en phase solide
TFA	acide trifluoroacétique
TFE	2,2,2-trifluoroéthanol
THF	tetrahydrofurane
TOCSY	<i>total coherence transfert spectroscopy</i>
Ts	tosyl
Val	L-valine

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Modèles de canal ionique synthétisés.....	42
<b>Tableau 2.</b> Études d'orientation du peptide <b>29</b> dans des bicouches lipidiques par ATR .....	67
<b>Tableau 3.</b> Valeur des $DL_{50}$ pour les composés testés sur les lignées de cellules cancéreuses .....	72
<b>Tableau 4.</b> Peptides-hôtes synthétisés .....	106
<b>Tableau 5.</b> Solubilité des composants des pseudorotaxanes dans le dichlorométhane .....	113
<b>Tableau 6.</b> Caractérisation des complexes par spectrométrie de masse ES . .....	115
<b>Tableau 7.</b> Attribution partielle des déplacements chimiques des protons du complexe $[63 \cdot DA] \cdot 2PF_6$ en RMN $^1H$ dans le chloroforme .....	120
<b>Tableau 8.</b> Étude du peptide <b>67</b> par RMN $^1H$ dans l'acétonitrile .....	127
<b>Tableau 9.</b> Étude du peptide <b>68</b> par RMN $^1H$ dans l'acétonitrile .....	132
<b>Tableau 10.</b> Structures secondaires des peptides et des complexes estimées d'après les études de dichroïsme circulaire .....	160
<b>Tableau 11.</b> Valeur des $K_a$ à 25 °C pour les différents hôtes et invités ....	168

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Transport passif du glucose dans la membrane des érythrocytes .	4
<b>Figure 2.</b> La membrane biologique .....	7
<b>Figure 3.</b> Modèle de canal ionique peptidique de DeGrado <i>et al.</i> ....	8
<b>Figure 4.</b> Deux grands groupes d'ionophores: a) les transporteurs b) les canaux ioniques .....	9
<b>Figure 5.</b> La valinomycine: composition chimique et structure de son complexe avec le potassium .....	10
<b>Figure 6.</b> Deux types de canaux ioniques naturels. a) L'amphotéricine: composition chimique et vue en coupe de la forme agrégée active. b) La gramicidine A: composition chimique et forme dimérisée active .....	12
<b>Figure 7.</b> Mode d'action hypothétique des bolaamphiphiles de Fyles <i>et al.</i> .....	13
<b>Figure 8.</b> Nanotubes peptidiques de Ghadiri <i>et al.</i> .....	14
<b>Figure 9.</b> Canal à potassium artificiel de Kobuke <i>et al.</i> .....	15
<b>Figure 10.</b> Mode d'activité proposé par Gokel <i>et al.</i> pour leurs canaux ioniques synthétiques .....	16
<b>Figure 11.</b> Canal à protons artificiel de Matile <i>et al.</i> .....	18
<b>Figure 12.</b> Deux mimiques de canal ionique basées sur des éthers-couronne chiraux et leur mode d'incorporation hypothétique dans les bicouches lipidiques. a) Les <i>bouquets</i> de Lehn <i>et al.</i> b) Le modèle de Fyles <i>et al.</i> .....	19
<b>Figure 13.</b> Les oligo-THF peptidiques de Koert <i>et al.</i> .....	20
<b>Figure 14.</b> Canal ionique photomodulable proposé par Stankovic et Schreiber .....	21

<b>Figure 15.</b> Conception d'un modèle de canal ionique artificiel de nature peptidique .....	24
<b>Figure 16.</b> Représentation schématique du modèle en conformation d'hélice $\alpha$ .....	25
<b>Figure 17.</b> Aspect chimique du modèle de canal ionique proposé .....	26
<b>Figure 18.</b> Schéma de synthèse de BOC-ECV-OH <b>14</b> .....	29
<b>Figure 19.</b> Schéma de préparation de la résine de Kaiser <b>20</b> .....	31
<b>Figure 20.</b> Schéma général de synthèse peptidique en phase solide avec la résine de Kaiser .....	33
<b>Figure 21.</b> Préparation d'un heptapeptide acide par clivage au DBU .....	35
<b>Figure 22.</b> Schéma général de condensation de segments en phase solide ..	37
<b>Figure 23.</b> Mécanisme d'épimérisation possible lors de l'activation au DIC .....	39
<b>Figure 24.</b> Clivage final des peptides fixés sur la résine de Kaiser .....	41
<b>Figure 25.</b> Courbes de DC associées aux principales structures secondaires de peptides: a) conformation aléatoire (1), feuillet $\beta$ (2) et hélice $\alpha$ (3) b) trois types de tournants $\beta$ .....	45
<b>Figure 26.</b> Études conformationnelles des modèles en solution par DC. a) Peptide <b>29</b> dans différents solvants b) Peptides <b>24</b> , <b>29</b> et <b>32</b> .....	48
<b>Figure 27.</b> Études de DC sur <b>29</b> à concentration variable dans le TFE ....	49
<b>Figure 28.</b> Études de DC sur <b>29</b> dans des vésicules .....	51
<b>Figure 29.</b> Étude de DC sur l'alaméthicine réalisée par Cascio et Wallace .....	52
<b>Figure 30.</b> Étude en FT-IR de <b>29</b> dans des bicouches lipidiques .....	54
<b>Figure 31.</b> Représentation schématique de l'antiport proton/cation métallique observé dans des conditions de « pH-stat » .....	57

<b>Figure 32.</b> Étude du pouvoir ionophore de <u>29</u> par la méthode de « pH-stat » .....	58
<b>Figure 33.</b> Représentation schématique du montage utilisé lors des mesures de conductivité monomoléculaire par la méthode de « <i>patch clamp</i> » .....	60
<b>Figure 34.</b> Conductivité des bicouches lipidiques mesurée en présence de <u>29</u> par la méthode de « <i>patch clamp</i> » a) signal associable à la présence d'un canal ionique dans la DiPhy b) même cas, dans le GMO c) conductivité aléatoire dans la DiPhy .....	62
<b>Figure 35.</b> Représentation théorique de la mesure de l'orientation moléculaire par spectroscopie infrarouge .....	65
<b>Figure 36.</b> Évaluation de la cytotoxicité de divers modèles de canal ionique sur les cellules de cancer du sein MDA .....	70
<b>Figure 37.</b> Évaluation de la cytotoxicité de divers modèles de canal ionique sur les cellules de leucémie de souris P388 .....	71
<b>Figure 38.</b> Mode d'activité proposé pour nos canaux ioniques artificiels ..	75
<b>Figure 39.</b> Le virus de la mosaïque du tabac et son processus d'auto-assemblage .....	81
<b>Figure 40.</b> Les <i>tectons</i> de Wuest <i>et al.</i> ....	82
<b>Figure 41.</b> Exemple de complexes basés sur des liens hydrogène obtenus par Whitesides <i>et al.</i> ....	83
<b>Figure 42.</b> Double hélicate circulaire de Lehn <i>et al.</i> ....	84
<b>Figure 43.</b> Un [2]caténate à base de cuivre(I) préparé par Sauvage <i>et al.</i> ....	85
<b>Figure 44.</b> Récepteur macrocyclique pouvant servir de catalyseur à certaines réactions de Diels-Alder proposé par Sanders <i>et al.</i> ....	86
<b>Figure 45.</b> Un système auto-réplcatif conçu par Tertfort et von Kiedrowski	

.....	87
<b>Figure 46.</b> Schéma de formation d'un [2]pseudorotaxane .....	88
<b>Figure 47.</b> Pseudorotaxane impliquant une cyclodextrine préparé par Wylie et Macartney .....	89
<b>Figure 48.</b> Polypseudorotaxane basé sur des interactions $\pi$ - $\pi$ aromatiques décrit par Parsons <i>et al.</i> ....	90
<b>Figure 49.</b> [2]rotaxane préparé par Stoddart <i>et al.</i> par blocage d'un pseudorotaxane préformé .....	90
<b>Figure 50.</b> [2]rotaxane préparé par Stoddart <i>et al.</i> par macrocyclisation autour d'un bras polyétheré .....	91
<b>Figure 51.</b> Schéma de formation d'un [2]caténane .....	92
<b>Figure 52.</b> [2]caténane impliquant une cyclodextrine synthétisé par Stoddart <i>et al.</i> ....	93
<b>Figure 53.</b> [4] et [5]caténanes ( <i>olympiadane</i> ) obtenus par Stoddart <i>et al.</i> ...	94
<b>Figure 54.</b> Hôtes et invités conçus pour la préparation des pseudorotaxanes peptidiques .....	98
<b>Figure 55.</b> Schéma de complexation d'un ammonium par un 18-couronne-6 a) mode <i>perché</i> et mode <i>niché</i> b) ammonium aliphatique primaire et secondaire .....	100
<b>Figure 56.</b> Éléments utilisés par Stoddart <i>et al.</i> pour la préparation d'un [2]pseudorotaxane à partir de sels d'ammoniums secondaires .....	101
<b>Figure 57.</b> Structure cristalline du [3]pseudorotaxane obtenu par Stoddart <i>et al.</i> avec DB24C8 et le diammonium DA•2PF <sub>6</sub> <u>69</u> .....	102
<b>Figure 58.</b> Schéma de synthèse de BOC-BEC-OH <u>74</u> .....	104
<b>Figure 59.</b> Schéma de synthèse du diammonium-invité DA•2PF <sub>6</sub> <u>69</u> ....	108
<b>Figure 60.</b> Schéma de synthèse du triammonium-invité TA•3PF <sub>6</sub> <u>70</u> ...	109



<b>Figure 61.</b> Schéma de préparation des complexes .....	112
<b>Figure 62.</b> Spectres de masse ES a) du peptide <b>63</b> b) du complexe <b>[63•DA]•2PF<sub>6</sub></b> .....	114
<b>Figure 63.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H 500 MHz dans le chloroforme du a) peptide <b>63</b> b) complexe <b>[63•DA]•2PF<sub>6</sub></b> .....	118
<b>Figure 64.</b> Spectre TOCSY partiel du complexe <b>[63•DA]•2PF<sub>6</sub></b> .....	119
<b>Figure 65.</b> Spectre RMN RMN <sup>1</sup> H 500 MHz dans le chloroforme du a) peptide <b>64</b> b) complexe <b>[64•DA]•2PF<sub>6</sub></b> .....	124
<b>Figure 66.</b> Spectre RMN RMN <sup>1</sup> H 500 MHz dans le chloroforme du a) peptide <b>66</b> b) complexe <b>[66•TA]•3PF<sub>6</sub></b> .....	125
<b>Figure 67.</b> Spectre RMN RMN <sup>1</sup> H 500 MHz dans l'acétonitrile du a) peptide <b>67</b> b) complexe <b>[67•DA]•2PF<sub>6</sub></b> .....	126
<b>Figure 68.</b> Spectre TOCSY partiel du complexe <b>[67•DA]•2PF<sub>6</sub></b> .....	129
<b>Figure 69.</b> Spectre RMN RMN <sup>1</sup> H 500 MHz dans l'acétonitrile du a) peptide <b>68</b> b) complexe <b>[68•DA]•2PF<sub>6</sub></b> .....	131
<b>Figure 70.</b> Spectre COSY partiel du complexe <b>[68•DA]•2PF<sub>6</sub></b> .....	134
<b>Figure 71.</b> Deux atropisomères possibles d'un [2]pseudorotaxane peptidique .....	136
<b>Figure 72.</b> Étude conformationnelle du peptide <b>63</b> par DC .....	140
<b>Figure 73.</b> Étude conformationnelle du complexe <b>[63•DA]•2PF<sub>6</sub></b> par DC .	141
<b>Figure 74.</b> Étude conformationnelle du peptide <b>64</b> par DC .....	144
<b>Figure 75.</b> Étude conformationnelle du complexe <b>[64•DA]•2PF<sub>6</sub></b> par DC .	145
<b>Figure 76.</b> Étude conformationnelle du peptide <b>65</b> par DC .....	148
<b>Figure 77.</b> Étude conformationnelle du peptide <b>66</b> par DC .....	149
<b>Figure 78.</b> Étude conformationnelle du complexe <b>[65•TA]•3PF<sub>6</sub></b> par DC .	150
<b>Figure 79.</b> Étude conformationnelle du complexe <b>[66•TA]•3PF<sub>6</sub></b> par DC .	151

<b>Figure 80.</b> Schéma représentant la conformation d'hélice $\alpha$ pour a) le peptide <u>65</u> b) le peptide <u>66</u> .....	152
<b>Figure 81.</b> Étude conformationnelle du peptide <u>67</u> par DC .....	154
<b>Figure 82.</b> Étude conformationnelle du complexe [ <u>67</u> •DA]•2PF <sub>6</sub> par DC .	155
<b>Figure 83.</b> Étude conformationnelle du peptide <u>68</u> par DC .....	157
<b>Figure 84.</b> Étude conformationnelle du complexe [ <u>68</u> •DA]•2PF <sub>6</sub> par DC .	158
<b>Figure 85.</b> Représentation schématique de la méthode d'extraction des picrates .....	164

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1. Spectres de RMN $^1\text{H}$ à une dimension .....	235
ANNEXE 2. Spectres de masse .....	289
ANNEXE 3. Courbes de dichroïsme circulaire .....	302
ANNEXE 4. Spectres COSY et TOCSY .....	308

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Au cours de millions d'années d'évolution, la Nature a fixé son choix sur un nombre limité de polymères qui sont à la base même de la vie et de l'apparition d'organismes de plus en plus complexes. Si, dans les conditions prébiotiques, le choix des « briques » permettant la constitution de ces macromolécules était peut-être limité, le fait que ces dernières soient aujourd'hui constituées par certains monomères, et non d'autres, ne peut être le fait du hasard. Ce phénomène est, au contraire, révélateur des qualités particulières dont disposent les monomères en question.

Les polypeptides sont une des trois grandes catégories de polymères biologiques et jouent un rôle, métabolique ou structural, capital pour la cellule vivante. Les polypeptides et les protéines naturels sont, pour leur immense majorité, constitués par 20 sous-unités possibles différentes: les acides aminés. Quelles sont donc les qualités intrinsèques de ces constituants, en nombre relativement restreint, pour parvenir à ces exemples de perfection chimique que sont, par exemple, les enzymes ?

Les acides aminés sont des composés chiraux polymérisables. Leur chiralité leur permet de « sous-entendre » une organisation spatiale très précise pour le polymère résultant de la formation du lien peptidique. De plus, ce lien, une liaison amide, est fort. Ceci permet de conférer de la stabilité au polypeptide.

Les acides aminés possèdent une chaîne latérale qui peut leur donner une fonction chimique (dans le site actif d'un enzyme), physique (par apport d'un caractère hydrophile ou lipophile) ou structurale (par une action mécanique sur la structure du polypeptide).

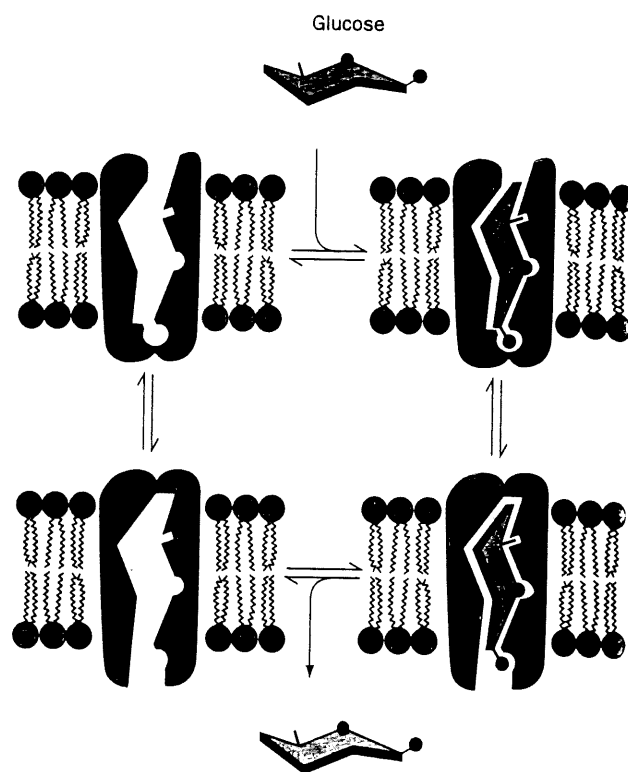
La Nature tire profit des qualités intrinsèques des acides aminés en les assemblant selon une séquence très précise, dictée par le code génétique, pour aboutir à ces macromolécules si spécifiques que sont les protéines. Mais cette spécificité ne peut être obtenue que si le polypeptide est parfaitement organisé. Et ceci n'est possible que dans le cas de protéines de relativement grande taille, sachant que les petits peptides ont plutôt tendance à adopter une conformation aléatoire, entropiquement favorisée.

Serait-il possible de conserver une partie des fonctions des protéines en utilisant des molécules de taille plus restreinte ?

D'un autre côté, la recherche chimique est aujourd'hui entrée de plein pied dans le domaine du nanomètre. La chimie covalente a permis, dans un passé récent, des réalisations extraordinaires dont des exemples sont les synthèses de la vitamine B12, de la palytoxine et du taxol. Mais, vue l'énergie déployée lors de ces réalisations, et son coût en potentiel humain, il apparaît que la chimie covalente ne peut guère dépasser le domaine de l'angström sans se heurter à des obstacles rédhibitoires. La préparation de structures moléculaires d'échelle nanométrique (les *nanstructures*) semble un rôle dévolu à la chimie supramoléculaire, dans laquelle la Nature est passée maîtresse incontestée.

Or, les polypeptides semblent un mode d'approche tout indiqué pour entrer dans le domaine de la chimie supramoléculaire. Et ce, en raison du rôle qu'ils jouent dans le monde vivant, et surtout, de la façon dont ils le jouent. La maîtrise de l'organisation structurale au niveau moléculaire puis, au niveau supramoléculaire, par le biais de phénomènes d'auto-assemblage très spécifiques, sont les clés de leur extraordinaire potentiel.

Dans les deux parties de ce travail, nous allons tenter de trouver un point commun entre la chimie de la Nature et celle des chimistes des nanostructures. Notre approche consistera en la préparation de molécules hybrides en terme de constituants biologiques et artificiels dans le but d'obtenir des composés possédant certaines propriétés des protéines.



**Figure 1.** Transport passif du glucose dans la membrane des érythrocytes

Les deux propriétés que nous avons choisies comme modèle d'étude sont le transport transmembranaire et l'auto-assemblage. Dans la Nature, l'un est souvent la résultante de l'autre. C'est par exemple le cas du transport passif du glucose dans les érythrocytes (Figure 1), où un processus d'auto-assemblage peptide-sucre permet un phénomène de transport spontané.

## **PREMIÈRE PARTIE**

### **SYNTHÈSE, ÉTUDES CONFORMATIONNELLES ET ACTIVITÉ DE CANAUX IONIQUES ARTIFICIELS**



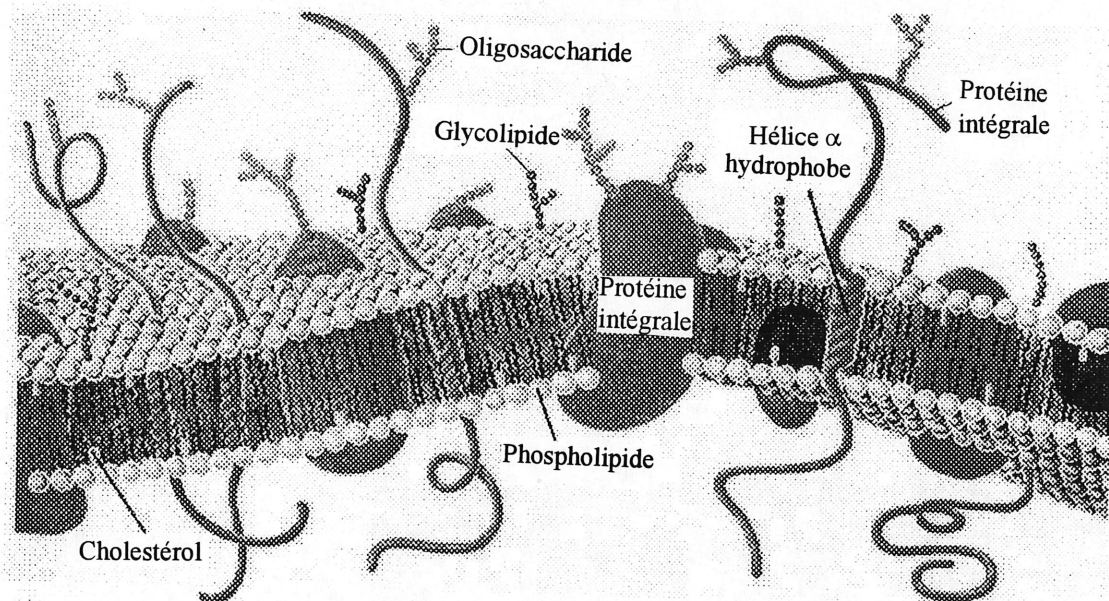
## INTRODUCTION

La membrane biologique (Figure 2) constitue une barrière entre la cellule et le monde extérieur. En induisant le phénomène de compartimentation, la première permet à la deuxième de préserver son unité. Cette barrière ne constitue cependant pas un mur infranchissable, mais est aussi un lieu d'échanges capital pour la cellule. De par sa nature essentiellement phospholipidique, la membrane peut être librement franchie par des molécules peu polaires, mais elle est absolument imperméable aux espèces très polaires ou chargées; ceci en raison de la quantité élevée d'énergie nécessaire au passage de ces dernières d'un milieu aqueux à un environnement lipophile (1). La circulation des molécules polaires, ou des ions, de l'extérieur à l'intérieur de la cellule, ou l'inverse, n'est possible que grâce à des processus de transport spécifiques et contrôlés.

Le transport transmembranaire est une des tâches accomplies par un autre constituant essentiel de la membrane que sont les protéines membranaires. Ces macromolécules amphiphiles « flottent » dans la bicouche lipidique en exposant leurs portions hydrophiles à l'environnement aqueux, et leurs parties hydrophobes au coeur lipidique de la membrane. Nous allons nous intéresser aux protéines impliquées dans les phénomènes de transport, et plus particulièrement à celles affectées au transport des ions, ce qui leur vaut le nom générique de *canaux ioniques* (2).

Le transport des ions est un processus capital pour la cellule. Il lui permet 1) de générer des gradients, via la consommation d'ATP (c'est le cas

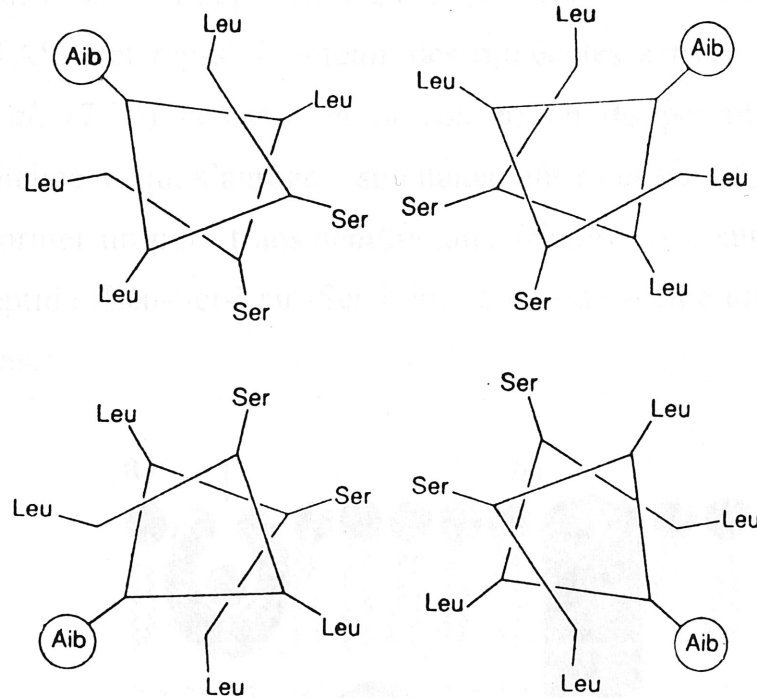
de l'ATPase-sodium/potassium) 2) de transporter d'autres molécules grâce à ces gradients préalablement créés (c'est le cas du symport sodium/glucose). Ces deux types de transport, qui impliquent la consommation ou la production d'énergie, sont appelés *transport actif* (3).



**Figure 2.** La membrane biologique

Une multitude de canaux ioniques est impliquée dans des processus biologiques aussi importants que la propagation de l'influx nerveux, la contraction musculaire, le métabolisme énergétique et la régulation hormonale (4). De ce fait, un dysfonctionnement de certains de ces canaux peut avoir de graves conséquences, comme l'épilepsie (5) ou la mucoviscidose (6). Cet ensemble de données fait de l'étude des canaux ioniques une priorité dans le

monde scientifique. Ainsi, de nombreux biochimistes et biologistes moléculaires ont concentré leurs efforts à déterminer la structure et la fonction de ces protéines (7).



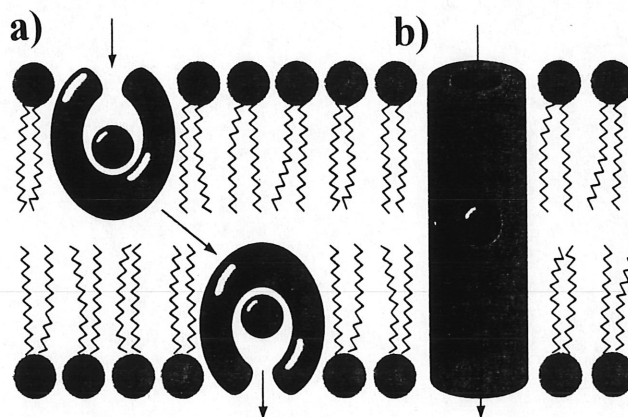
**Figure 3.** Modèle de canal ionique peptidique de DeGrado *et al.*

Il a été remarqué que la plupart des canaux ioniques bien étudiés est constituée par des protéines comportant 4 ou 5 domaines, organisés en hélice  $\alpha$ , qui traversent la bicouche lipidique de part en part. C'est le cas, par exemple, du récepteur synaptique de l'acétylcholine (8).

Il reste cependant beaucoup à apprendre sur le mécanisme d'action des canaux ioniques. Et vues les difficultés d'isolement et de manipulation de ces

macromolécules, la nécessité d'étudier des modèles simplifiés semble s'imposer. C'est ce rôle qui est dévolu aux chimistes.

Mutter et Montal (9) ont utilisé l'assemblage de parties fonctionnelles de canaux ioniques sur des supports rigides (« *Template-Assembled Synthetic Proteins* », TASP) et réussi à obtenir des molécules actives. L'approche de DeGrado *et al.* (7,10) consiste en la conception de peptides amphiphiles organisés en hélice  $\alpha$ , qui s'agrègent spontanément en ensemble de 4 à 6 sous-unités pour former un pore transmembranaire (Figure 3). Leurs modèles sont actifs et le peptide (Leu-Ser-Leu<sub>3</sub>-Ser-Leu)<sub>3</sub> démontre même une sélectivité de canal à protons.

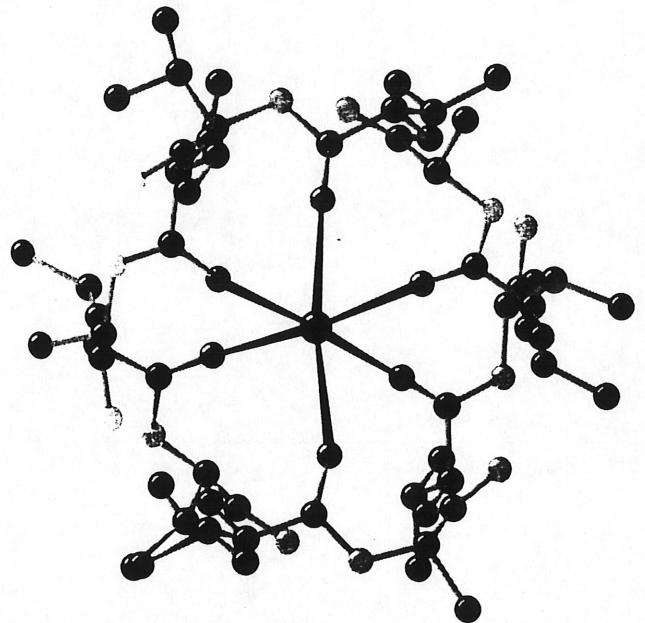
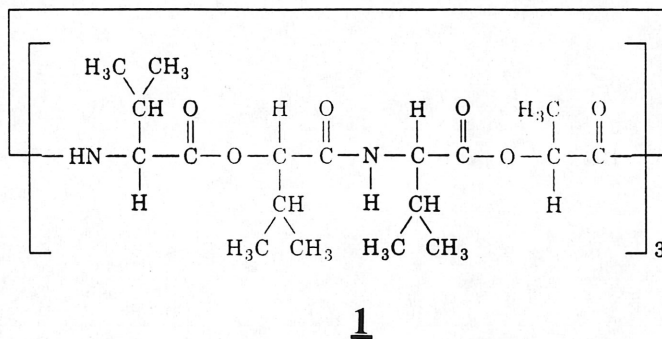


**Figure 4.** Deux grands groupes d'ionophores: a) Les transporteurs. b) Les canaux ioniques

Les autres groupes lancés dans la conception de canaux ioniques artificiels ont résolument pris l'option de molécules moins naturelles. Néanmoins, tous gardent comme modèles certains composés biologiques

relativement simples qui ont une activité d'ionophore. Ces molécules transportent les ions sans consommation ou production d'énergie, en utilisant des gradients préexistants. On appelle ce processus un *transport passif*.

Ces composés sont, pour la plupart, des métabolites secondaires de micro-organismes et possèdent une activité antibiotique. On peut répartir ces ionophores en trois grands groupes, selon le mode de transport des ions qui leur est propre:



**Figure 5.** La valinomycine: composition chimique et structure de son complexe avec le potassium

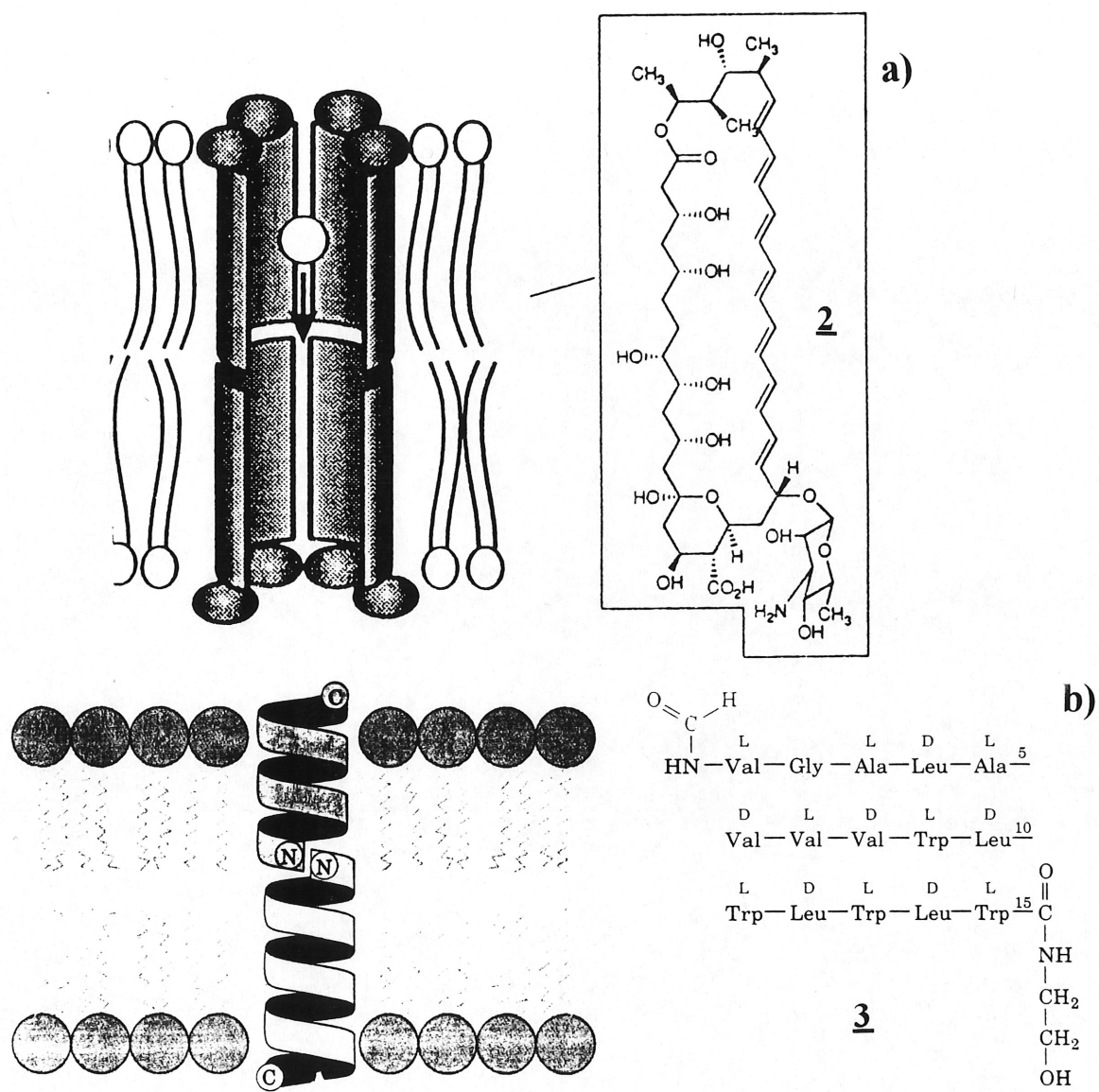
1) Les *transporteurs* (Figure 4a): Ces composés forment un complexe avec un ion et celui-ci « voyage » au travers de la membrane avant d'être libéré de l'autre côté. Les transporteurs sont en général très spécifiques à un

type d'ion et, dans leur cas, la vitesse du transport est influencée par la température. La valinomycine **1** (11) appartient à ce groupe. Il s'agit d'un depsipeptide cyclique, formé d'une alternance d'acides  $\alpha$ -aminés et d' $\alpha$ -hydroxyacides. Cette molécule forme des complexes très stables avec le potassium (Figure 5).

2) Les *perturbateurs de membranes*. Leur activité d'ionophore n'est pas spécifique. Elle est plutôt un artefact résultant de leur fonction réelle. On peut citer l'exemple de la melittine. Ce peptide de 26 acides aminés est un constituant essentiel du venin d'abeille. Il s'organise en hélice  $\alpha$  et forme des agrégats possédant une certaine activité d'ionophore. Mais son rôle biologique est de briser les bicouches lipidiques pour provoquer l'hémolyse (12).

3) Les *canaux* (Figure 4b): Dans ce cas, l'ionophore ne complexe pas l'ion et il n'est pas mobile. Il génère simplement un pore polaire dans la bicouche, au travers duquel les ions peuvent passer. Ces composés ne peuvent être fonctionnels que si la bicouche est d'épaisseur inférieure à leur longueur. Les canaux conduisent les ions 1000 à 10000 fois plus rapidement que les transporteurs. On peut les diviser en deux sous-groupes: a) Les canaux qui sont constitués de plusieurs monomères qui doivent s'agréger afin de constituer un pore dans la membrane. C'est le cas de l'amphotéricine **2** (Figure 6a). Ses sous-unités macrocycliques amphiphiles s'agrègent en forme de tonneau. Ceci permet d'orienter les hydroxyles vers l'intérieur, générant un pore hydrophile, et les parties oléfiniques vers l'environnement lipidique. Ce canal n'est pas très spécifique et même de petites molécules non ioniques peuvent l'emprunter (13). b) Les canaux qui sont constitués par des pores préformés. La gramicidine A **3** (Figure 6b) est le plus connu de ces composés.





**Figure 6.** Deux types de canaux ioniques naturels. a) L'amphotéricine: composition chimique et vue en coupe de la forme agrégée active. b) La gramicidine A: composition chimique et forme dimérisée active

Les travaux sur les canaux ioniques synthétiques que nous décrivons ci-dessous peuvent être associés aux sous-groupes 3a et 3b.

The figure displays the chemical structures of three polymers, labeled 4, 5, and 6, and a schematic diagram illustrating their self-assembly into vesicles.

**Chemical Structures:**

- 4:** A poly(ester ether) with a repeating unit containing a long aliphatic chain and a terminal carboxylic acid group ( $\text{HO}_2\text{C}$ ).
- 5:** A poly(ester ether) with a repeating unit containing a long aliphatic chain and a terminal dimethylamino group ( $\text{Me}_2\text{N}$ ).
- 6:** A poly(ester ether) with a repeating unit containing a long aliphatic chain and a terminal carboxylic acid group ( $\text{CO}_2\text{H}$ ).

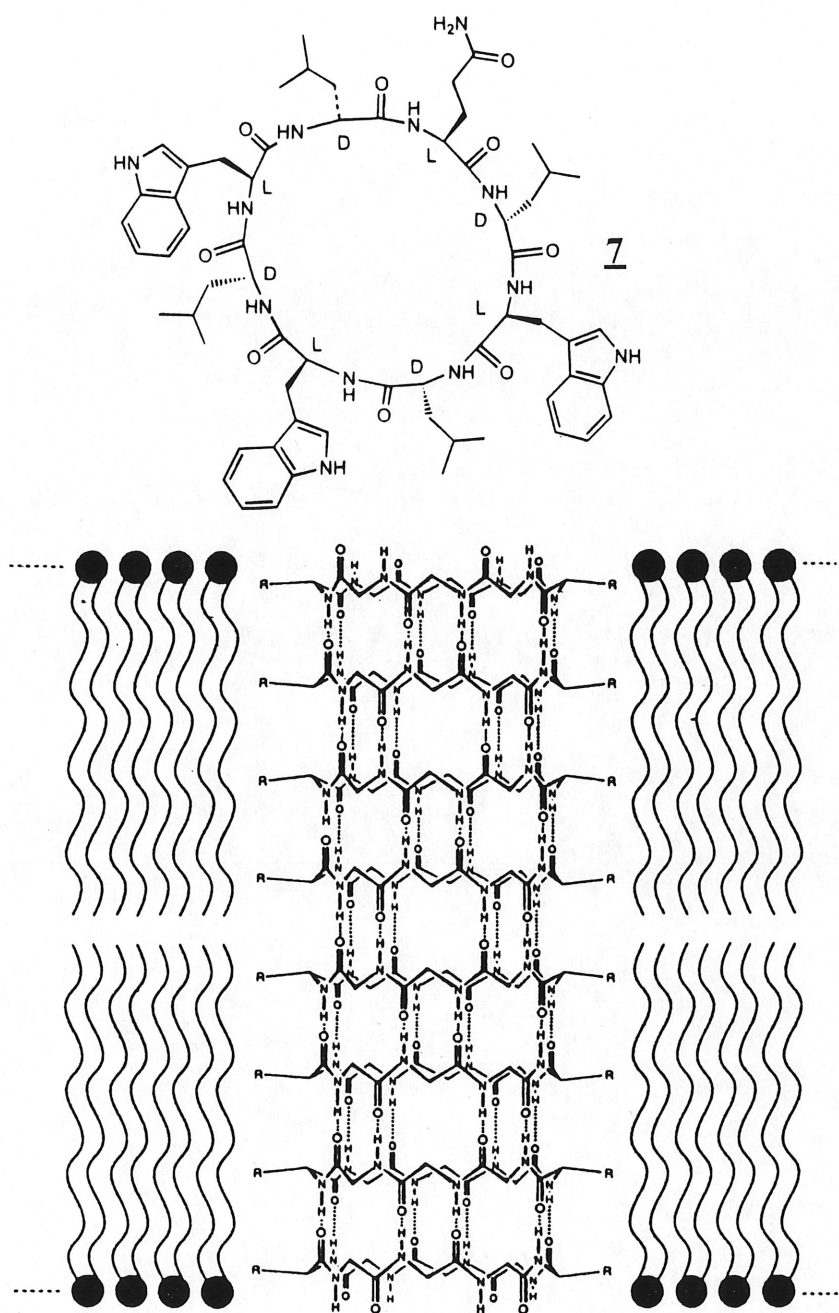
**Self-Assembly Schematic:**

The schematic illustrates the self-assembly of the polymers into vesicles, showing four stages (A, B, C, D) connected by equilibrium arrows ( $\rightleftharpoons$ ):

- A:** The polymers are in a disordered state, represented by a random arrangement of black and white circles.
- B:** The polymers form a bilayer structure, with the hydrophobic tails (black circles) facing each other and the hydrophilic heads (white circles) facing the water.
- C:** The bilayer structure is shown in a more organized state, with the hydrophobic tails (black circles) facing each other and the hydrophilic heads (white circles) facing the water.
- D:** The polymers form a vesicle structure, with the hydrophobic tails (black circles) facing each other and the hydrophilic heads (white circles) facing the water.

13

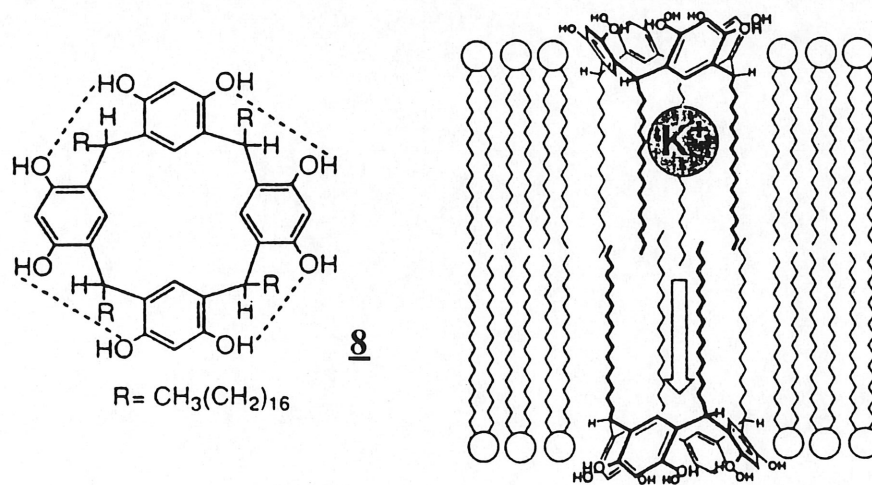




**Figure 8.** Nanotubes peptidiques de Ghadiri *et al.*

Fyles *et al.* (15) ont décrit une famille de bolaamphiphiles (par exemple 4, 5 et 6) présentant une remarquable activité de canal ionique. Ces monomères, relativement simples et bien caractérisés, semblent s'agréger dans les bicouches lipidiques pour former un pore (Figure 7). Le groupe de Regen (16) propose quant à lui un modèle de l'amphotéricine, basé sur un dérivé polyétheré de l'androstène, qui conduit le sodium au travers des bicouches de petits vésicules.

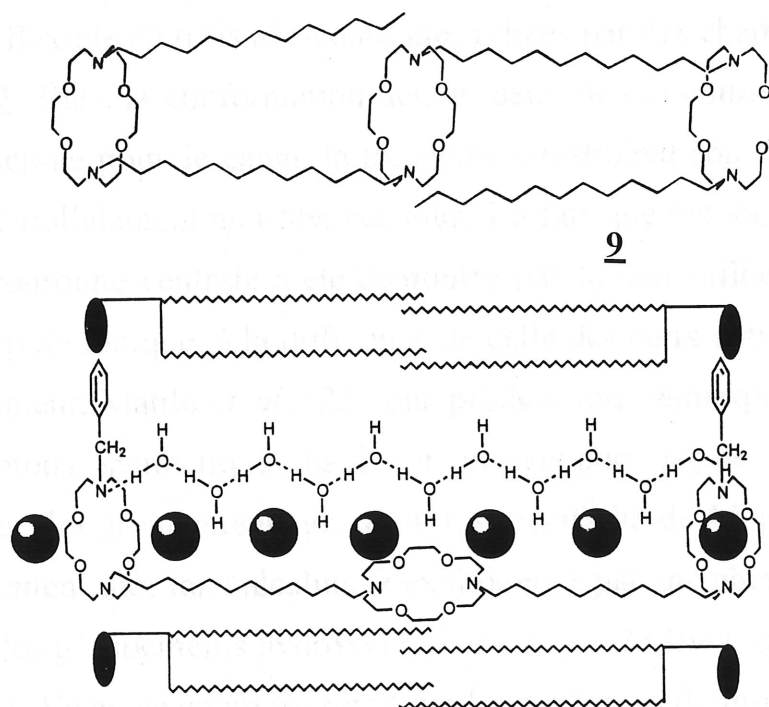
Ghadiri *et al.* (17) ont obtenu de remarquables résultats avec l'octapeptide cyclique 7, constitué d'une alternance d'acides aminés D et L. Ces composés sont connus pour former des nanotubes, grâce à la création de nombreux liens hydrogène intermoléculaires; ceci étant permis par leur forme aplatie (18). Ils s'avèrent conduire le sodium et le potassium de façon très efficace, vraisemblablement de par le mode d'organisation décrit dans la Figure 8.



**Figure 9.** Canal à potassium artificiel de Kobuke *et al.*

Il est à noter que si l'amphotéricine s'agrège parallèlement aux lipides de la bicouche, ces peptides le font eux de façon perpendiculaire, en bénéficiant du milieu favorable à la formation de liens hydrogène que constitue un environnement très apolaire.

Les autres travaux résumés ci-dessous, bien que très différents dans leurs approches, ont tous en commun la conception et la synthèse de molécules ayant pour finalité la formation d'un canal ionique monomoléculaire ou, à tout le moins, préformé (sous-groupe 3b).



**Figure 10.** Mode d'activité proposé par Gokel *et al.* pour leurs canaux ioniques synthétiques

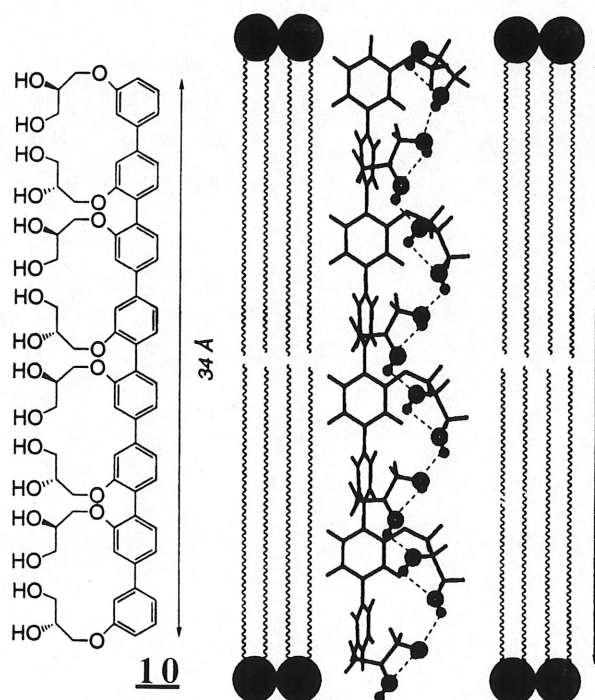
C'est le groupe de Tabushi (19) qui a le premier décrit un modèle de canal ionique calqué sur le mode d'action de la gramicidine A. Un composé amphiphile, constitué d'une cyclodextrine ramifiée par de longues chaînes aliphatiques, est conçu pour dimériser à l'intérieur d'une membrane. Les seuls résultats publiés décrivent le transport d'ions cobalt. Plus récemment, Kobuke *et al.* (20) ont, suivant un modèle similaire, proposé un canal spécifique au potassium. La tête polaire du composé **8** est constitué par un calixarène et celui-ci s'avère actif, malgré l'absence notable de groupement polaire au coeur du canal (Figure 9).

Le groupe de Gokel (21) travaille depuis quelques années sur un assemblage flexible de trois aza-couronnes reliées par des chaînes aliphatiques, dérivés de **9**. Dans la conformation active, deux de ces couronnes serviraient de tête d'ancrage pour le canal; la troisième constituant son coeur polaire en s'orientant parallèlement au trajet des ions. Le fait que les ions ne passent pas dans cette couronne centrale a été démontré par la non influence de sa taille sur la sélectivité ionique, à la différence de celle des deux autres (Figure 10).

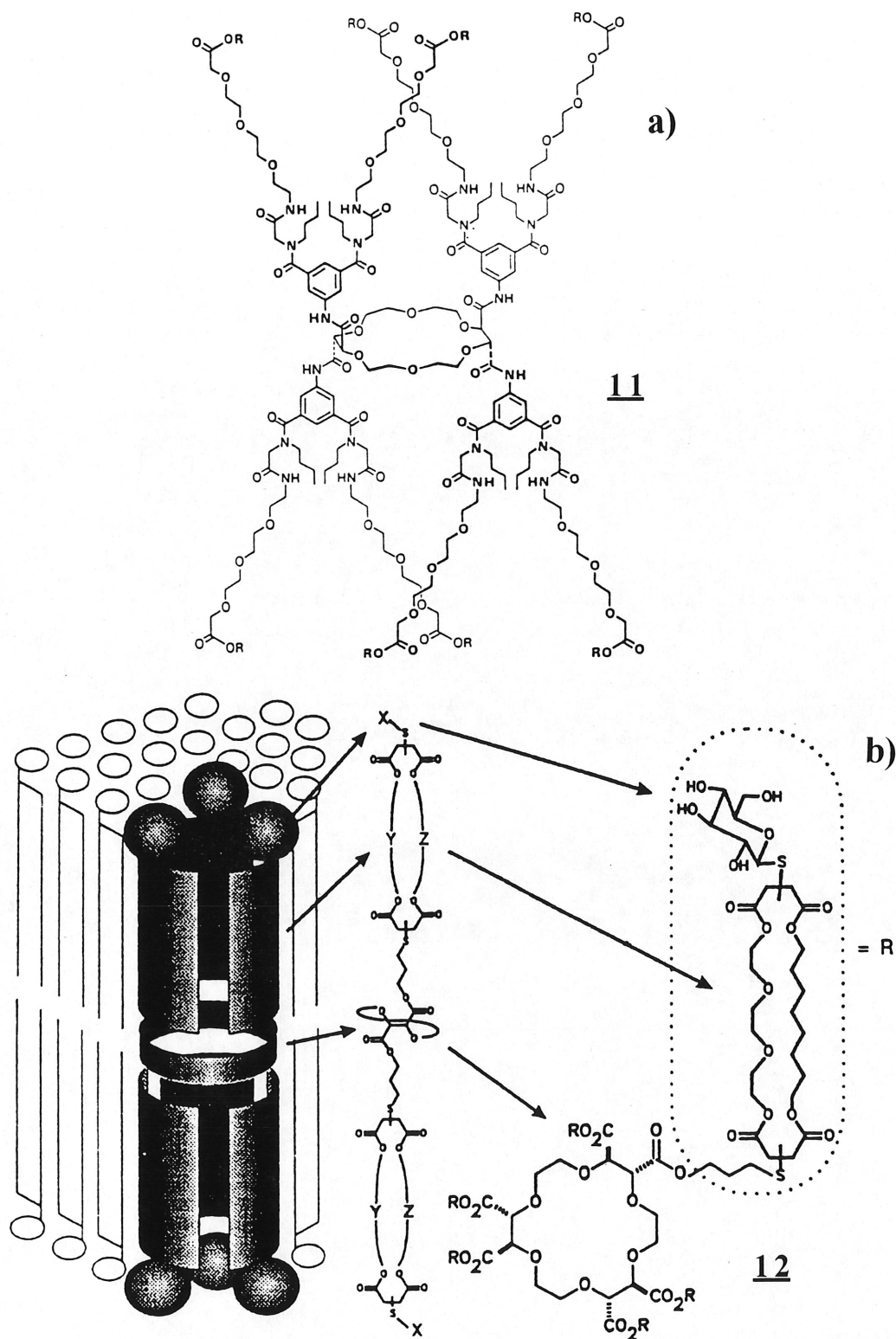
Récemment, Matile *et al.* (22) ont produit une remarquable étude d'un canal à protons synthétique, basé sur un support rigide de polyphénols étherifiés par des groupements glycérol. La spécificité de **10** pour les protons, comparativement aux ions alcalins, s'expliquerait par un phénomène de relai impliquant les groupements hydroxyles de la molécule. Bien qu'il forme des agrégats dans l'eau, ce composé serait actif sous forme de monomère dans les bicouches lipidiques, lorsqu'utilisé à faibles concentrations (Figure 11).

Jullien et Léhn (23) ont proposé un modèle de canal ionique bâti sur un macrocycle central: éther-couronne chirale ou cyclodextrine. A ce macrocycle sont ancrés des bras polyoxyéthylène, qui se terminent par des groupements

carboxylate. Ces molécules « bouquet » **11** permettent de transporter des ions alcalins contenus dans des vésicules, mais leur mode d'action reste relativement flou (Figure 12a). S'appuyant sur le même concept de base, le groupe de Fyles (24) a préparé un ensemble de composés permettant la construction de grosses molécules complexes, telles que **12**, assez semblables aux *bouquets*. Celles-ci sont schématiquement constituées d'un éther-couronne chiral (le coeur) ramifié par des bolaamphiphiles variés (les murs) et terminés par divers groupements hydrosolubles (les têtes polaires) (Figure 12b). Si ces composés ont donné des résultats encourageants lors d'études par la méthode de « pH-stat » (cf. 3.2), ils n'ont jamais produit de preuve formelle d'activité de canal ionique. De plus, ils se sont avérés non caractérisables, aussi bien par RMN que par spectrométrie de masse.

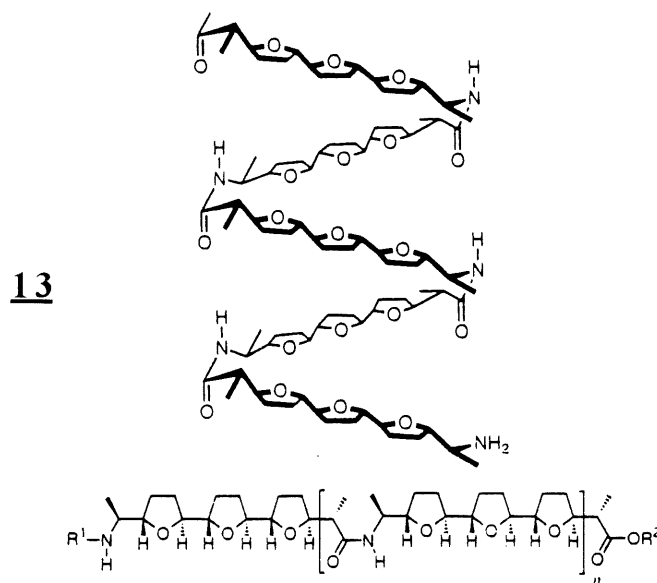


**Figure 11.** Canal à protons artificiel de Matile *et al.*



**Figure 12.** Deux mimiques de canal ionique basées sur des éther-couronnes chiraux et leur mode d'incorporation hypothétique dans les bicouches lipidiques. a) Les *bouquets* de Lehn *et al.* b) Le modèle de Fyles *et al.*

Certains polymères, préparés à partir de sous-unités bien définies, sont à la base de modèles de canaux ioniques synthétiques. Seebach *et al.* (25) ont rapporté l'activité ionophore de certains acides polyhydroxybutanoïques. De son côté, le groupe de Koert (26) a décrit un modèle élégant, quoique de synthèse assez ardue, de peptide comportant des poly-THF chiraux. Le poly-THF **13** adopte une conformation hélicoïdale qui lui permet d'orienter les atomes d'oxygène des éthers vers l'axe de l'hélice (Figure 13). Les molécules amphiphiles ainsi préparées n'ont cependant pas encore démontré d'activité d'ionophore.

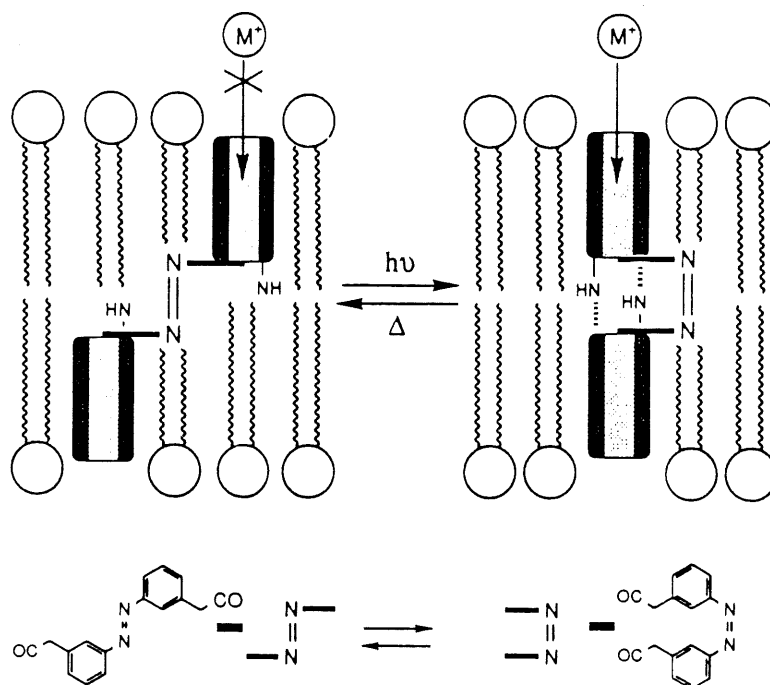


**Figure 13.** Les oligo-THF peptidiques de Koert *et al.*

Nous pouvons également citer les groupes impliqués dans l'ingénierie de canaux ioniques naturels. La gramicidine A se prête bien à ce type de travaux. Stankovic et Schreiber (27) ont dimérisé deux molécules de gramicidine grâce à un groupement azobenzène. Ils produisent ainsi un canal dont l'activité est

photomodulable (Figure 14). De son côté, le groupe de Woolley (28) a inséré les groupements photosensibles à l'orifice du pore de la gramicidine; permettant ainsi d'en moduler l'activité à l'échelle moléculaire.

Enfin, certains exemples de « protocanaux » ont été décrits par les groupes de Fuhrhop (29), Menger (30) et Kobuke (31). Il s'agit de composés amphiphiles ou zwitterioniques qui, insérés dans une bicouche lipidique, la rendent perméable aux ions. Comme il s'agit plus de savons sophistiqués (quoique respectant l'intégrité de la membrane) que de réels ionophores, nous ne les avons pas classés parmi les canaux ioniques. Néanmoins, Kobuke *et al.* rapportent une activité très similaire à celle d'un canal ionique naturel.



**Figure 14.** Canal ionique photomodulable proposé par Stankovic et Schreiber



Éclairés par ces exemples aussi divers qu'élégants, nous nous proposons de concevoir un modèle de canal ionique artificiel possédant tous les « prérequis » d'activité dans une seule molécule. Nous nous situerons donc dans le sous-groupe 3b. Et le très petit nombre d'exemples de ce type qui se sont avérés actifs, ou clairement caractérisables, n'en rend le défi que plus attrayant.

## CHAPITRE 1

### CONCEPTION ET SYNTHÈSE DU MODÈLE

#### 1.1 Préambule

Concevoir un composé devant avoir une fonction précise implique non seulement la synthèse d'une molécule, mais aussi de ses propriétés (« *property directed synthesis* ») (32). Nous nous devons ici de définir les caractéristiques générales requises pour espérer obtenir une activité d'ionophore transmembranaire, de concevoir une molécule qui semble les posséder, d'en effectuer la synthèse et la caractérisation et, enfin, de tester son hypothétique activité. Le projet serait mené à bien si l'on parvenait alors à interpréter le mode d'action du composé et de comparer cette interprétation aux hypothèses émises au départ.

#### 1.2 Conception d'un modèle de canal ionique artificiel

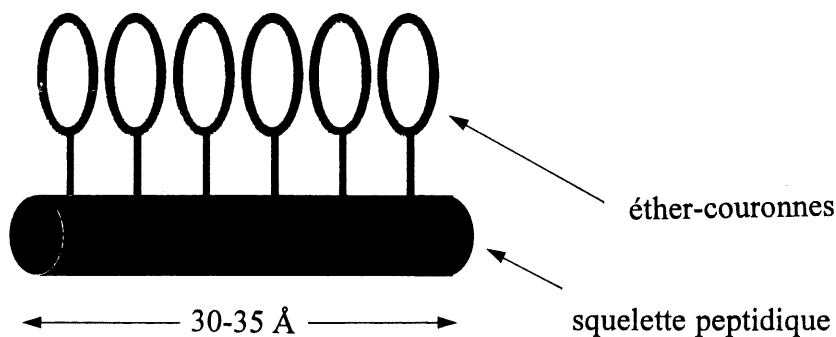
##### 1.2.1 Prérequis

A la lumière de l'abondante littérature parue sur le sujet (7,10b,19,24b), nous pouvons énoncer les caractéristiques communes aux composés qui possèdent une activité de canal ionique: 1) La molécule doit avoir une nature hydrophobe et être quasiment insoluble dans l'eau, ceci afin de s'intégrer

préférentiellement dans la bicouche lipidique et de façon relativement stable. 2) Elle doit être amphiphile et sa partie polaire doit constituer un « cœur » au centre des zones hydrophobes. 3) Ce cœur polaire doit posséder un rayon suffisamment grand pour permettre le passage d'ions. 4) Le composé doit être d'une longueur suffisante pour traverser complètement une bicouche lipidique; soit au moins 3 nm. 5) Éventuellement, il doit posséder des composantes très hydrophiles à ses extrémités, lui permettant de s'orienter et de « s'ancrer » dans la membrane.

L'aspect des propriétés étant considéré, nous pouvons envisager une molécule possédant ces caractéristiques et nous attacher à rendre réalisable sa synthèse.

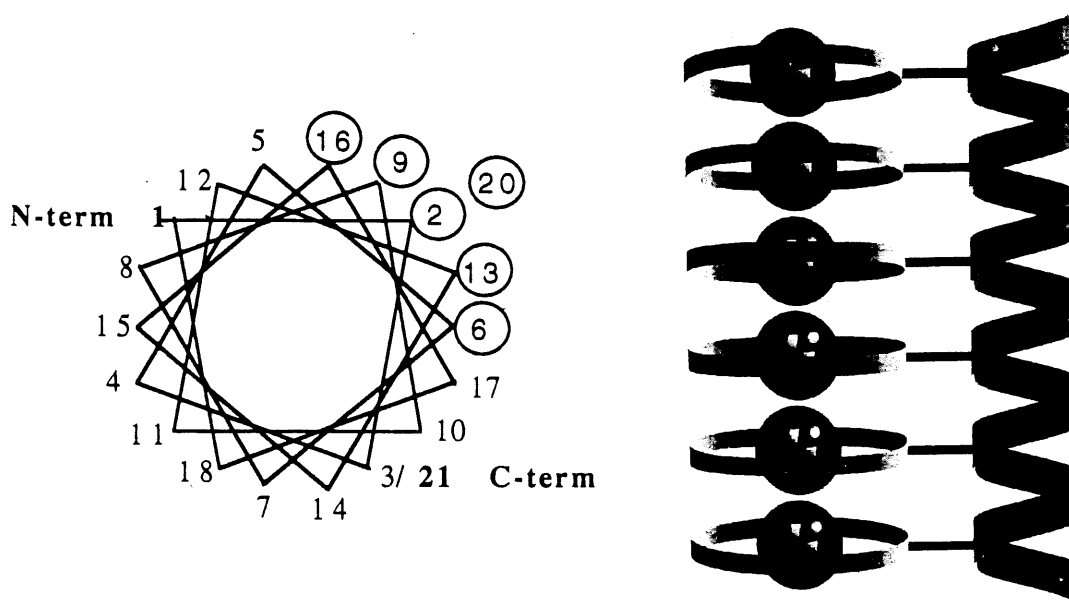
### 1.2.2 Modèle choisi



**Figure 15.** Conception d'un modèle de canal ionique artificiel de nature peptidique

Le modèle est schématisé dans la Figure 15. Nous envisageons de donner une nature peptidique au squelette du composé. Le choix des peptides nous

permet de bénéficier de plusieurs avantages. D'une part, leurs constituants, les acides aminés, sont facilement disponibles et constituent des « briques » prédéfinies qui rendront la synthèse plus aisée. De plus, ils offrent une gamme de polarité très variée, suivant la nature de leur chaîne latérale. Enfin, la chiralité des acides aminés, et le choix judicieux de ceux-ci, peut nous permettre certaines prédictions quant à la conformation spatiale qu'adoptera la molécule.



**Figure 16.** Représentation schématique du modèle en conformation d'hélice  $\alpha$

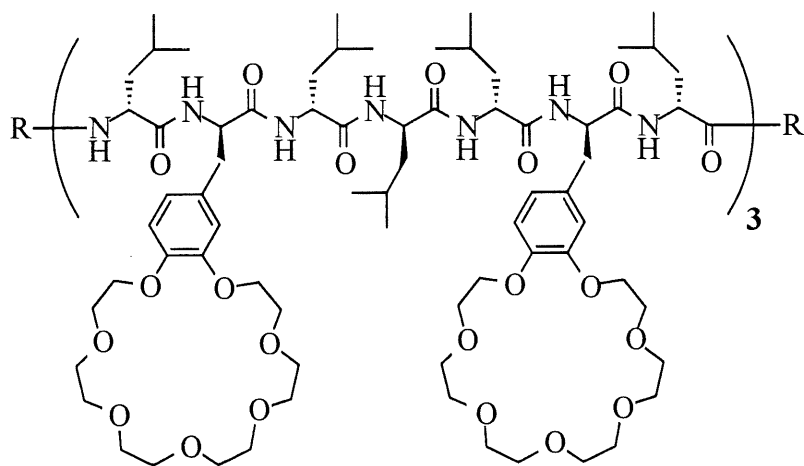
Ce troisième aspect est important pour l'organisation du coeur polaire du composé. Il sera constitué par des éthers-couronne. Mais la nécessaire formation d'un « tunnel » polaire impose l'alignement des macrocycles. Nous espérons parvenir à ce but en: 1) les introduisant à des endroits stratégiques dans la séquence primaire du peptide, soit les positions 2, 6, 9, 13, 16 et 20; 2) choisissant les acides aminés appropriés pour orienter le peptide vers une

structure secondaire d'hélice  $\alpha$  (Figure 16). Le diamètre du pore pourra être modulé par le choix de l'éther-couronne.

Enfin, nous opterons pour une stratégie de synthèse nous permettant de jouer facilement sur la taille du peptide et d'y incorporer aisément diverses têtes polaires.

### 1.2.3 Aspect chimique

La molécule-cible sera un peptide de 21 acides aminés (Figure 17). Ceci devrait lui permettre de traverser complètement la bicouche lipidique s'il adopte une conformation d'hélice  $\alpha$  (7). En effet, une hélice  $\alpha$  compte 3.6 résidus acide aminé par tour et son pas mesure environ 5.4 Å (3). Ce qui impose au peptide de posséder au moins 20 résidus pour espérer avoir une longueur de 30 Å.



**Figure 17.** Aspect chimique du modèle de canal ionique proposé

Pour rendre la synthèse plus facile, le composé sera le produit de la trimérisation d'un segment heptapeptide. Ce dernier sera constitué de 5 résidus L-leucine et de 2 résidus L-phénylalanine modifiés chimiquement pour porter des 21-couronne-7. Le choix de la leucine a été fait en raison de sa haute hydrophobie (33) et de sa propension à induire des structures d'hélice  $\alpha$  (34). Nous avons choisi le 21-couronne-7 pour notre principal modèle, car cette couronne n'est pas reconnue pour complexer fortement les ions sodium ou potassium. En effet, si un transporteur doit nécessairement former un complexe stable avec l'ion hôte, il en va différemment dans le cas d'un canal ionique. La gramicidine A n'a aucun pouvoir complexant sur les cations alcalins (35), contrairement à la valinomycine; et malgré cela, la première reste un ionophore beaucoup plus efficace. Dans notre cas, l'éther-couronne devra simplement produire un environnement favorable au passage des ions.

Les couronnes seront situées aux positions 2 et 6 dans l'heptapeptide et donc, aux positions 2, 6, 9, 13, 16 et 20 dans le peptide final. Ceci devrait permettre la formation d'un tunnel polaire, si le modèle adopte la conformation hélicoïdale désirée (Figure 16).

#### 1.2.4 Stratégie générale de synthèse

Celle-ci sera divisée en cinq parties distinctes détaillées ci-dessous. La première partie concernera la synthèse en solution d'un acide aminé artificiel porteur d'un éther-couronne. Les quatre autres parties seront constituées par de la synthèse peptidique sur support solide. Les nombreux avantages conférés par cette technique, en termes de rendement, facilité d'isolement des produits,

facilité de manipulation, *etc...* sont connus depuis les travaux de Merrifield (36), qui ont été récompensés par un prix Nobel.

Nous pouvons scinder notre approche de la façon suivante:

- 1) préparation d'un segment heptapeptide sur un support solide incluant deux acides aminés modifiés en éther-couronne
- 2) clivage d'une partie de l'heptapeptide synthétisé
- 3) trimérisation de cet heptapeptide par condensation du segment préalablement clivé sur le peptide conservé fixé sur le support
- 4) clivage final du peptide de 21 acides aminés.

Notre stratégie comportera ainsi une partie convergente qui rendra la préparation du peptide beaucoup plus accessible.

### 1.3 Synthèse du modèle

Nous avons préparé plusieurs variantes de notre modèle initial. Ce sous-chapitre décrira la synthèse de la molécule que nous avons le plus étudiée et nous indiquerons à quels endroits la synthèse a divergé pour conduire aux autres composés.

#### 1.3.1 Synthèse de la *N*-BOC-3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanine

##### BOC-ECV-OH 14

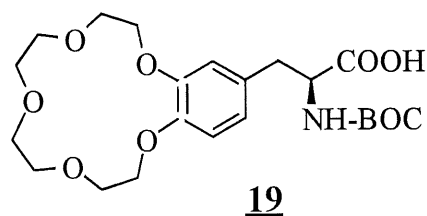
Selon un protocole précédemment décrit (37), nous préparons le dibromure 15 par traitement de l'hexaéthylène glycol à la triphénylphosphine





D'un autre côté, la L-DOPA **16** commerciale est diprotégée sous forme d'ester méthylique (groupement carbonyle) et de *t*-butyloxycarbamate (fonction amine). Nous poursuivons par une réaction de macrocyclisation impliquant **15** et **17**, dans le DMF; et ce, à une température strictement contrôlée de 50 °C afin de limiter la racémisation. Cette réaction s'effectue dans des conditions de haute dilution, afin de favoriser la double substitution nucléophile intramoléculaire. Le bon rendement obtenu lors de cette réaction (pouvant aller jusqu'à 60 %) peut s'expliquer par l'assistance de l'ion césium, qui favorise la réaction intramoléculaire. Ce processus est connu sous le nom « *d'effet-template* » (38). Après saponification de l'ester **18**, nous recueillons l'acide aminé protégé désiré sous forme solide, par précipitation à partir d'un mélange méthanol/éther/hexane. Le rendement global de la synthèse de **14** est de 34 %.

Selon le même protocole, mais en utilisant du tétraéthylène glycol en début de synthèse, nous avons préparé l'homologue 15-couronne-5 de **14**. La synthèse de BOC-ECQ-OH **19** a été réalisée avec un rendement global de 37 %.

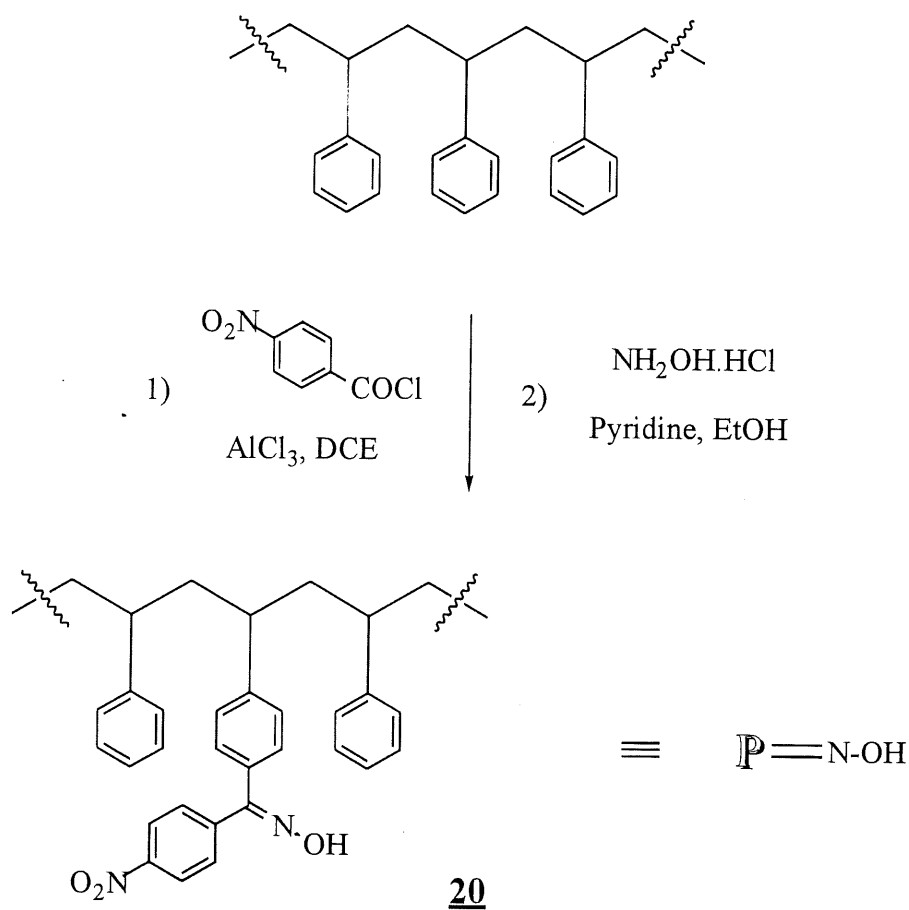


### 1.3.2 Synthèse peptidique en phase solide

Tous les peptides décrits dans les deux parties de ce travail ont été préparés sur support solide selon le protocole décrit ci-dessous.

### 1.3.2.1 Préparation de la résine de Kaiser (résine oxime) 20

Notre choix de support solide s'est fixé sur la résine de Kaiser (39).



**Figure 19.** Schéma de préparation de la résine de Kaiser 20 (39)

Il s'agit d'un polystyrène, réticulé par 1 % de divinylbenzène, sur lequel ont été greffés, de façon statistique, des groupements *p*-nitrobenzoyloxime. Le peptide est accroché sur la résine par le biais d'un lien ester d'oxime; formé entre le support solide et le carbonyle du premier acide aminé. Ce lien est

suffisamment stable pour permettre l'élongation du polypeptide et assez labile pour pouvoir être clivé par un nucléophile, dans des conditions relativement douces. De plus, étant donné la stabilité de ce lien ester en conditions basique ou acide, il permet de travailler en « stratégie BOC », le groupement *ter*-butyloxycarbonyle devant être éliminé dans un environnement très acide.

Nous utilisons du polystyrène réticulé au divinylbenzène (Figure 19) que nous traitons par du chlorure de *p*-nitrobenzoyle, dans des conditions de Friedel-Crafts. Suite à l'acylation de quelques groupements aromatiques du polystyrène, nous faisons réagir de l'hydroxylamine sur les cétones introduites, pour générer les fonctions oxime. Après de nombreux lavages, nous obtenons la résine **20**, prête à être utilisée directement en synthèse peptidique. Celle-ci possède entre 0.5 et 0.7 millimole de sites oxime par gramme de résine sèche.

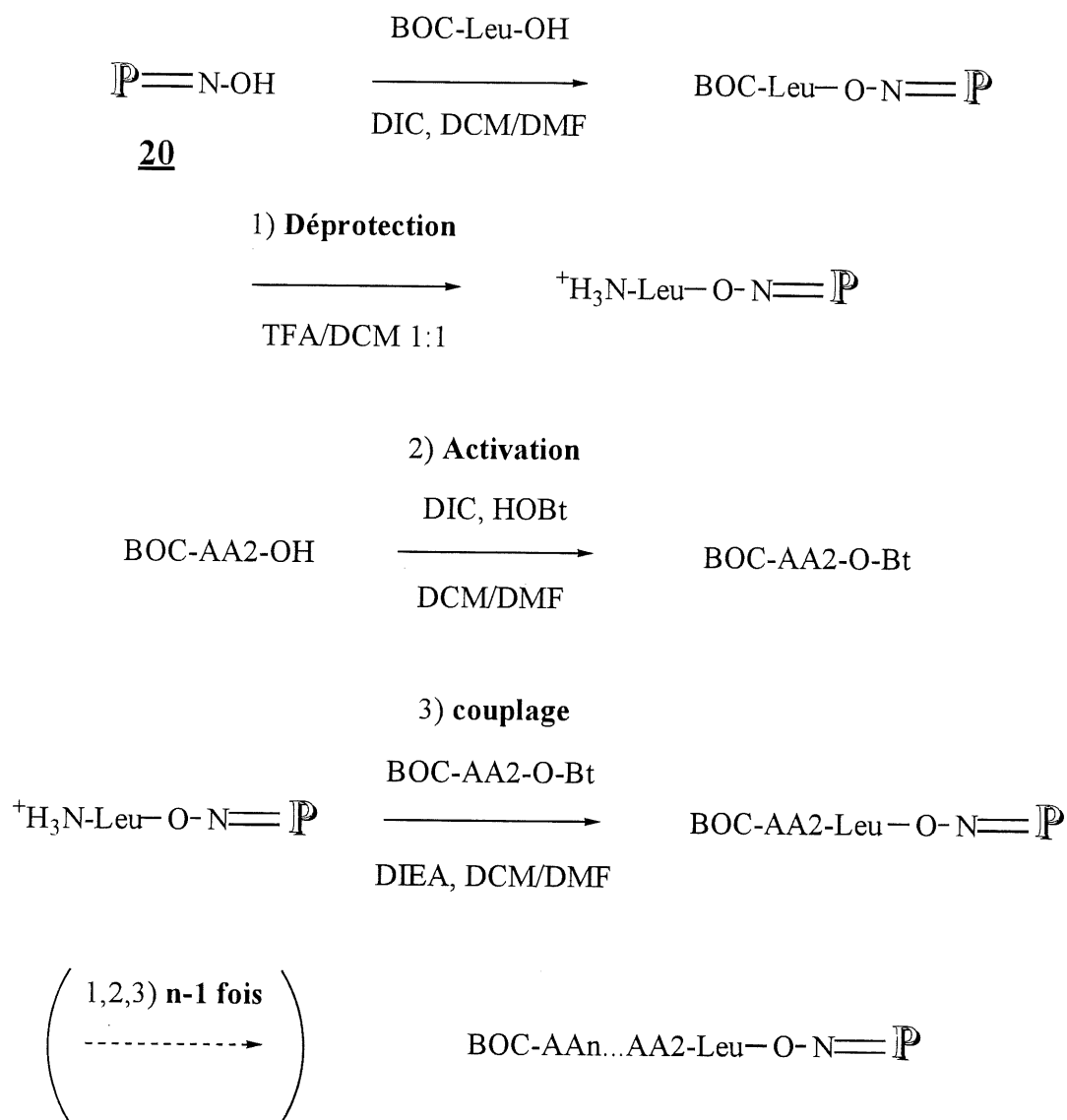
#### 1.3.2.2 Synthèse du segment heptapeptide sur support solide

##### BOC-Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu-Résine

Le schéma général de la *synthèse peptidique en phase solide* (SPPS) est représenté dans la Figure 20. Il sera identique pour tous les peptides.

La résine oxime **20** est incorporée dans une ampoule à synthèse peptidique. Le premier acide aminé est fixé sur la résine, après activation de sa fonction acide par du diisopropylcarbodiimide (DIC). Il s'agit ici de la BOC-Leu. La réaction de couplage dure environ 24 heures, en raison de la

faible nucléophilie de la fonction oxime. Après cette première réaction, les sites oxime non substitués sont bloqués par acétylation (anhydride acétique) et, éventuellement, benzylation (chlorure de benzoyle).



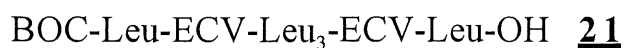
**Figure 20.** Schéma général de synthèse peptidique en phase solide avec la résine de Kaiser

Nous déterminons alors le taux de substitution de la résine par le test quantitatif de Kaiser à la ninhydrine (40). Cette étape sert à ajuster les quantités de chaque composant utilisé pour la suite de la synthèse. Néanmoins, à l'expérience, ce test s'est avéré sous-estimer les taux de substitution. Nous avons contourné ce problème en augmentant le nombre d'équivalents de réactifs.

La fonction amine du premier acide aminé fixé est déprotégée par élimination du groupement BOC en milieu acide (acide trifluoroacétique/DCM 1:1). Nous pouvons alors ajouter le deuxième acide aminé à coupler (BOC-ECV-OH dans ce cas). Celui-ci aura été préalablement activé au DIC pour être estérifié par l'hydroxybenzotriazole (HOBt). De la diisopropyléthylamine (DIEA), base non nucléophile, est ajoutée pour neutraliser le sel trifluoroacétate d'ammonium produit lors de la réaction d'élimination du groupement BOC. A la fin de la réaction de couplage (environ 3 heures), le taux de succès de celui-ci est estimé par le test qualitatif de Kaiser à la ninhydrine (40).

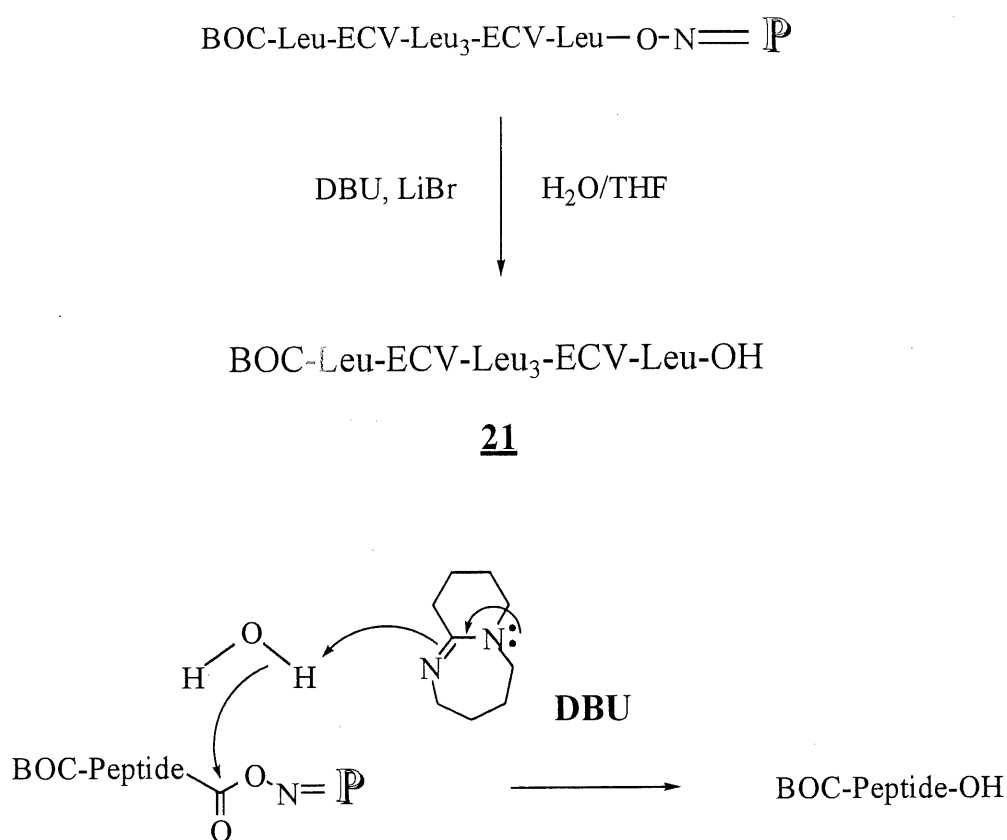
Le cycle déprotection-activation-couplage est répété jusqu'à l'obtention de l'heptapeptide désiré.

#### 1.3.2.3 Clivage du segment - préparation de l'heptapeptide acide



De par sa sensibilité aux nucléophiles, la résine oxime permet d'introduire de très nombreuses fonctions en C-terminal de l'heptapeptide à cliver. Notre stratégie de synthèse nous impose de produire le segment

heptapeptidique sous sa forme acide. Or, l'eau n'est pas un nucléophile suffisamment fort pour effectuer l'opération seule. Nous avons du adapter un protocole de transestérification décrit par Seebach *et al.* (41), faisant intervenir du 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène (DBU), en présence de bromure de lithium. Le DBU (Figure 21) joue vraisemblablement le rôle de catalyseur basique, augmentant ainsi le caractère nucléophile de l'eau.



**Figure 21.** Préparation d'un heptapeptide acide par clivage au DBU

Le lithium sert à rendre plus solubles les sels peptidiques produits, mais peut également intervenir comme acide de Lewis en activant le groupement

carbonyle de l'ester d'oxime. Nous avons pu généraliser cette réaction à de nombreux alcools, comme le méthanol, l'alcool benzylique ou le glycérol; nous pouvons ainsi produire les esters peptidiques correspondants lors de l'étape de clivage (42).

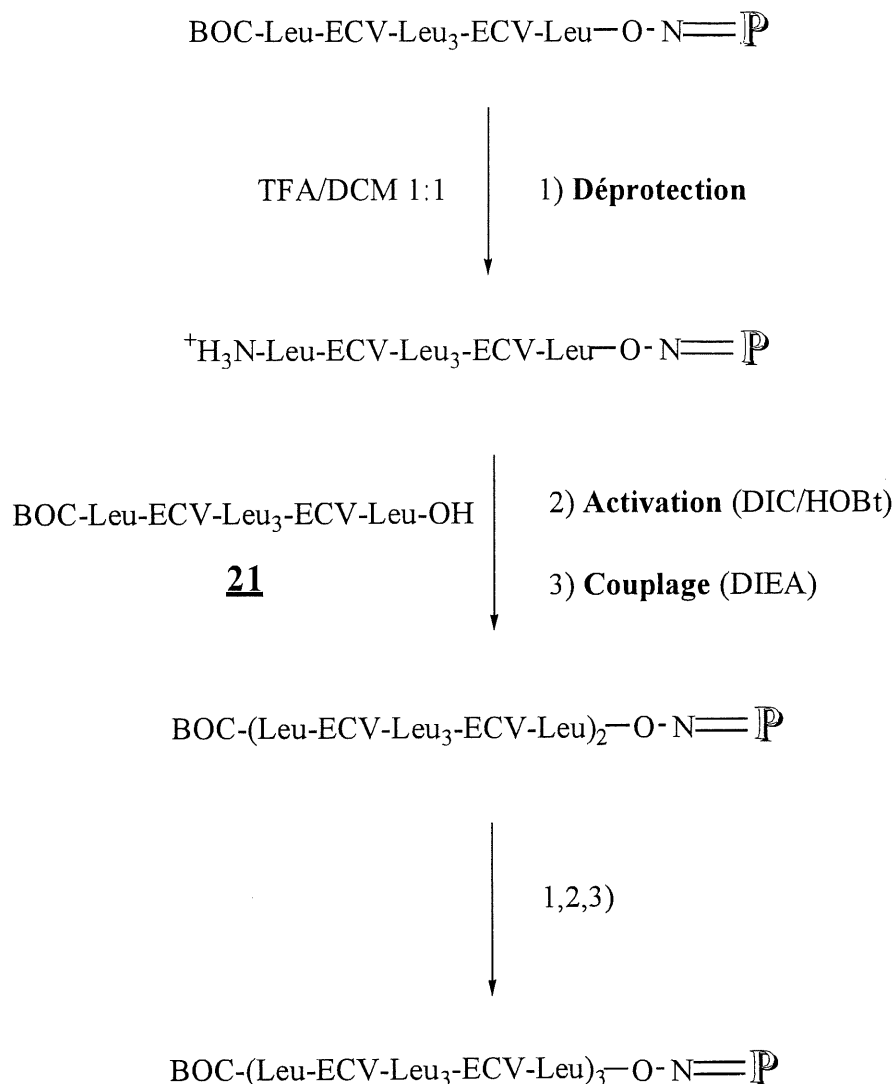
Nous utilisons les 3/4 de la quantité totale de résine portant notre heptapeptide. Nous additionnons à celle-ci du DBU et du bromure de lithium, dans un mélange THF/eau 9:1. Nous produisons ainsi l'heptapeptide acide **21** désiré. Le restant de résine est conservé afin de servir de support lors de la trimérisation de notre segment heptapeptidique.

Selon les protocoles décrits en 1.3.2.2 et 1.3.2.3, nous avons également préparé les heptapeptides acides BOC-Leu-ECQ-Leu<sub>3</sub>-ECQ-Leu-OH **22** et BOC-Leu-Phé-Leu<sub>3</sub>-Phé-Leu-OH **23**.

En utilisant ces mêmes stratégies, mais en substituant le méthanol au mélange THF/eau en 1.3.2.3, nous préparons les esters d'heptapeptide BOC-Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu-OMe **24** et BOC-Leu-ECQ-Leu<sub>3</sub>-ECQ-Leu-OMe **25**.

La totalité de ces produits a été caractérisée par RMN <sup>1</sup>H et par spectrométrie de masse. De plus, leur pureté a été évaluée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

### 1.3.2.4 Condensation des segments heptapeptide sur support solide



**Figure 22.** Schéma général de condensation de segments en phase solide

Cet aspect de la synthèse peptidique, consistant en l'assemblage de plusieurs fragments du peptide cible préalablement synthétisés, est connue sous l'appellation de *condensation de segments en phase solide* (CSPS) (43).

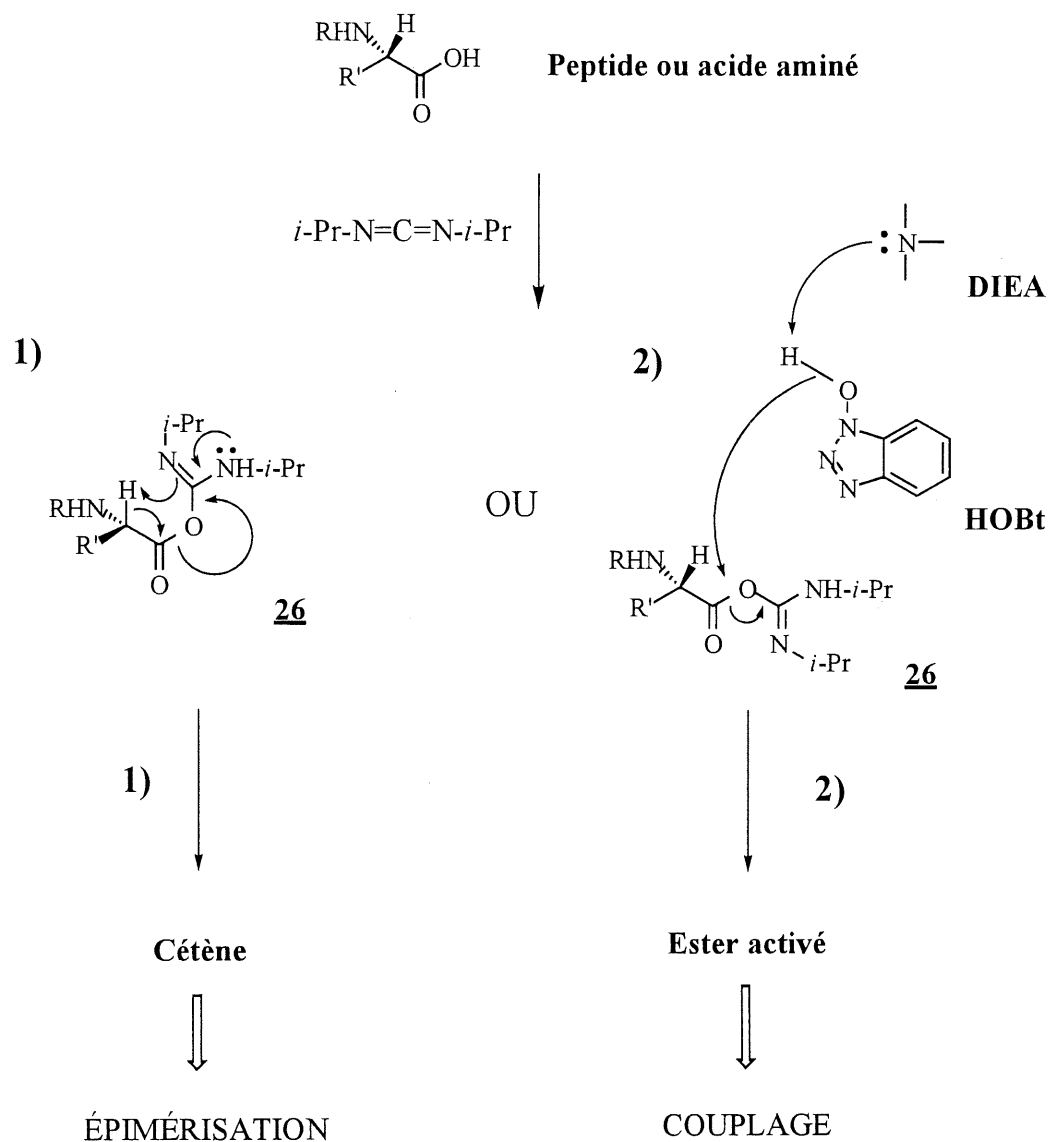


Elle a notamment été utilisée pour la synthèse de longs polypeptides (44) dont la préparation par la voie linéaire classique s'avérait très ardue. Cette méthode présente l'avantage de restreindre la synthèse à des peptides relativement courts (10-25 acides aminés) et, surtout, de faciliter la purification en fin de synthèse. Elle s'adapte parfaitement à notre projet, dans lequel le peptide cible est le trimère d'un heptapeptide. La purification se résumera donc à séparer les heptapeptides et tetradecapeptides contaminants du peptide désiré par HPLC. Ceci, bien-sûr, à condition que l'heptapeptide ait été synthétisé avec un haut degré de pureté (au moins 80%).

La stratégie générale (Figure 22) consiste à utiliser comme support solide le dernier 1/4 de résine où l'heptapeptide est fixé, et qui n'a pas été clivé ci-dessus. Pour le reste, la synthèse est semblable à la SPPS classique, le segment heptapeptide acide étant utilisé comme un acide aminé. La différence essentielle réside dans le temps de couplage, qui est ici de 24 heures.

L'inconvénient majeur de la CSPS est l'épimérisation (Figure 23) qui peut se produire sur l'heptapeptide acide à coupler. Lors de l'activation par le DIC, l'intermédiaire **26** est normalement attaqué par HOBt (cas 2) pour donner l'ester activé. Néanmoins, l'encombrement stérique plus important présent dans le peptide acide, par rapport à un acide aminé, fait que l'attaque par HOBt est moins favorisée. Ceci laisse le temps nécessaire pour que se produise une réaction intramoléculaire d'arrachement de proton sur le carbone- $\alpha$ , celui-ci étant devenu assez acide dans le cas de **26** (cas 1).

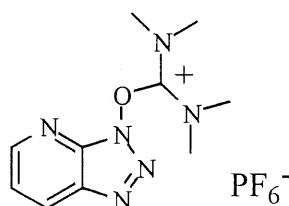
Nous avons donc essayé divers agents de couplage qui permettent d'éviter l'utilisation des diimides.



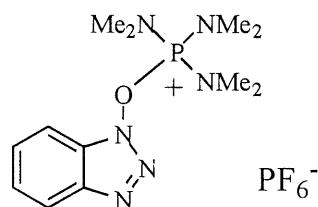
**Figure 23.** Mécanisme d'épimérisation possible lors de l'activation au DIC

C'est par exemple le cas de HATU 27 et du réactif de Castro (BOP) 28. Ces composés permettent de former directement l'ester activé, via une attaque nucléophile, de type  $S_N2'$ , du carboxylate du peptide sur le diazo de l'agent

d'activation. Néanmoins, dans ces cas également, nous avons noté qu'il se produisait de l'épimérisation et avons préféré conserver une méthode déjà éprouvée (45).



**27**



**28**

Nous trimérisons (ou dimérisons suivant les cas) nos peptides suivant la méthode d'activation au DIC/HOBt, précédemment décrite.

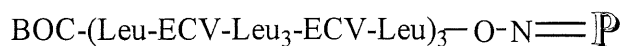
#### 1.3.2.5 Clivage final du peptide

BOC-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-OMe **29**

La méthode utilisée pour le clivage final du peptide est similaire à celle décrite en 1.3.2.3. Néanmoins, dans le cas de **29**, nous désirions obtenir un ester méthylique; le méthanol a donc été utilisé en remplacement du mélange THF/eau, en présence de DBU et de bromure de lithium. La Figure 24 schématise ce clivage. « R-OH » indique que divers alcools peuvent être employés pour conduire à l'ester correspondant (42).

Nous obtenons selon cette méthode le composé BOC-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-OMe **29**. Mais aussi, ses homologues BOC-(Leu-ECQ-Leu<sub>3</sub>-ECQ-

Leu)<sub>3</sub>-OMe **30**, BOC-(Leu-Phé-Leu<sub>3</sub>-Phé-Leu)<sub>3</sub>-OMe **31** et BOC-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>2</sub>-OMe **32**. Dans ce dernier cas, le clivage a été effectué après la première étape de CSPS.



DBU, LiBr

R-OH



**29** (R = Me)

**Figure 24.** Clivage final des peptides fixés sur la résine de Kaiser

#### 1.3.2.6 Autres composés préparés

Nous avons cherché à préparer des homologues de **29** possédant diverses « têtes » polaires. Pour ce faire, nous avons utilisé les peptides fixés sur résine obtenus en 1.3.2.4.

1) *N*-terminal: un groupement polaire est introduit soit par simple élimination du groupement BOC, qui permet l'obtention du sel d'ammonium; soit en faisant suivre cette élimination d'une condensation sur l'anhydride pyromellitique, qui conduit au triacide correspondant (Pyr).

2) *C*-terminal: il suffit ici de cliver le peptide en employant un nucléophile polaire. Nous avons utilisé l'eau, pour produire l'acide; le

glycérol, pour produire le diol (Gly); et l'éthylène diamine, pour produire l'ammonium (EDA).

L'ensemble des composés obtenus en SPPS est consigné dans le Tableau 1. Ces produits ont tous été purifiés par HPLC, puis caractérisés par RMN  $^1\text{H}$  et par spectrométrie de masse « *electrospray* » (ES) ou « *fast atom bombardment* » (FAB). Nous ne rapportons que les masses correspondant à l'ion moléculaire, quand celui-ci a pu être observé que ce soit par ES ou FAB.

**Tableau 1.** Modèles de canal ionique synthétisés

Peptide	Nom	Formule	Masse calculée	Masse observée
<u>24</u>	BOC-Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu-OMe	C <sub>78</sub> H <sub>129</sub> N <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	1549	1548
<u>25</u>	BOC-Leu-ECQ-Leu <sub>3</sub> -ECQ-Leu-OMe	C <sub>70</sub> H <sub>113</sub> N <sub>7</sub> O <sub>20</sub>	1373	1372
<u>32</u>	BOC-(Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu) <sub>2</sub> -OMe	C <sub>150</sub> H <sub>246</sub> N <sub>14</sub> O <sub>45</sub>	2966	2966
<u>29</u>	BOC-(Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu) <sub>3</sub> -OMe	C <sub>222</sub> H <sub>363</sub> N <sub>21</sub> O <sub>66</sub>	4382	4382
<u>30</u>	BOC-(Leu-ECQ-Leu <sub>3</sub> -ECQ-Leu) <sub>3</sub> -OMe	C <sub>198</sub> H <sub>315</sub> N <sub>21</sub> O <sub>54</sub>	3854	?

Peptide	Nom	Formule	Masse calculée	Masse observée
<b><u>31</u></b>	BOC-(Leu-Phé-Leu <sub>3</sub> -Phé-Leu) <sub>3</sub> -OMe	C <sub>150</sub> H <sub>231</sub> N <sub>21</sub> O <sub>24</sub>	2712	2712
<b><u>33</u></b>	H-(Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu) <sub>3</sub> -OH	C <sub>216</sub> H <sub>353</sub> N <sub>21</sub> O <sub>64</sub>	4269	4269
<b><u>34</u></b>	H-(Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu) <sub>3</sub> -EDA	C <sub>218</sub> H <sub>359</sub> N <sub>23</sub> O <sub>63</sub>	4310	4310
<b><u>35</u></b>	H-(Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu) <sub>3</sub> -Gly	C <sub>219</sub> H <sub>359</sub> N <sub>21</sub> O <sub>66</sub>	4342	4342
<b><u>36</u></b>	Pyr-(Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu) <sub>3</sub> -OH	C <sub>226</sub> H <sub>357</sub> N <sub>21</sub> O <sub>71</sub>	4505	4505

#### 1.4 Conclusion

Nous avons préparé et caractérisé plusieurs variantes de notre modèle initial. Nous allons maintenant décrire les études conformationnelles et d'activité effectuées sur ces composés. Nous espérons pouvoir analyser l'influence de la taille des couronnes et de la nature des têtes polaires sur l'activité du modèle. Certaines molécules, comme **24**, **25** et **32**, qui ne possèdent pas une longueur suffisante pour traverser une bicouche lipidique, ou comme **31**, dépourvu de couronne, serviront de composés de référence.

## CHAPITRE 2

### ÉTUDES CONFORMATIONNELLES SUR LES MODÈLES

#### 2.1 Préambule

Les peptides cibles étant synthétisés, il nous faut maintenant vérifier que ces molécules adoptent bien une conformation préférentielle d'hélice  $\alpha$ , qui est nécessaire à l'alignement des couronnes dans l'espace.

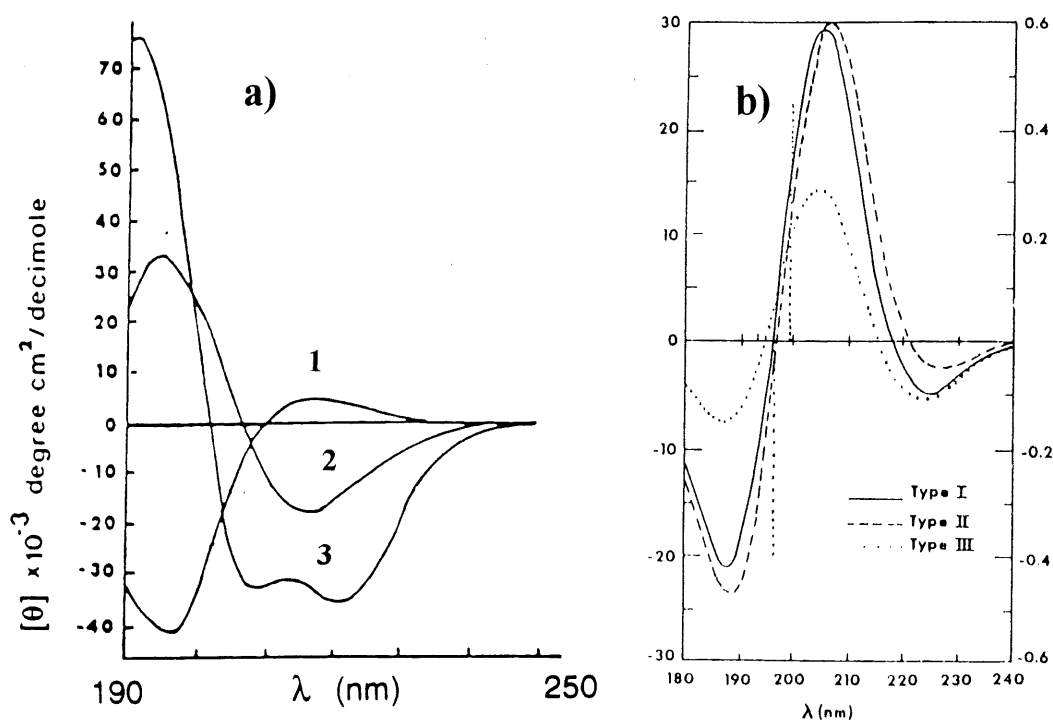
Pour effectuer ces études nous avons eu recours à deux techniques spectroscopiques: la spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire (DC) et la spectroscopie infra-rouge (FT-IR).

#### 2.2 Études conformationnelles par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire

##### 2.2.1 La spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire

La spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique qui s'applique aux molécules chirales en solution. Nous allons tirer profit de la pureté énantiomérique de nos peptides pour recueillir des informations quant à leur conformation dans différents média.

Le DC consiste en l'application d'une lumière polarisée circulairement (une lumière « chirale ») sur un échantillon du composé étudié en solution (46). Dans notre cas, nous allons travailler dans les longueurs d'onde de la lumière ultraviolette et les spectres DC vont mettre en évidence les transitions  $\pi-\pi^*$  et  $n-\pi^*$  des carbonyles des liens peptidiques. Étant donné l'environnement chiral dans lequel ceux-ci sont situés, leur comportement vis-à-vis de la lumière chirale sera différent en fonction de leur orientation spatiale. Ceci permettra de produire des spectres qui seront autant « d'empreintes digitales » d'un composé donné, dans un solvant donné.



**Figure 25.** Courbes de DC associées aux principales structures secondaires de peptides: a) conformation aléatoire (1), feuillet  $\beta$  (2) et hélice  $\alpha$  (3); b) trois types de tournants  $\beta$  (46-50)



Le dichroïsme circulaire est généralement exprimé en *ellipticité molaire*  $\Theta$ , en degré.centimètre-carré par décimole.

Le DC est d'une très grande utilité lors des études conformationnelles de peptides (46-50), étant donné que les structures secondaires de ces composés produisent des courbes très caractéristiques (Figure 25). Dans la courbe 3, correspondant à une structure d'hélice  $\alpha$ , le minimum à 222 nm correspond à un transfert électronique  $n-\pi^*$ , tandis que le minimum à 208 nm et le maximum à 191 nm correspondent tous deux à des transitions  $\pi-\pi^*$ .

Dans le cas d'une protéine, qui contient plusieurs types de structures secondaires, la courbe DC représente une moyenne de ces conformations et des programmes permettent de calculer les différents pourcentages de chaque structure présentes dans la molécule. Mais dans le cas de courts peptides, on est en droit d'espérer que ceux-ci ne posséderont qu'un seul type de structure secondaire, et donc la courbe DC pourrait donner directement la conformation spatiale du peptide. Cependant, les petits peptides ont souvent l'inconvénient de présenter un équilibre conformationnel entre plusieurs types d'organisation. Donc, dans ce cas, les conclusions tirées du DC devront rester précautionneuses.

Le DC n'en reste pas moins un outil de choix pour espérer répondre à nos questions quant à la structure secondaire de nos composés.

## 2.2.2 Études de spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire dans divers solvants

Les résultats présentés ici correspondent aux études des peptides diprotégés contenant les 21-couronne-7. Les autres expériences seront rapidement analysées et les spectres présentés dans les Annexes.

Les peptides BOC-Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu-OMe **24**, BOC-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>2</sub>-OMe **32** et BOC-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-OMe **29** sont solubles dans tous les solvants d'intérêt en DC. Nous avons choisi d'utiliser:

- le trifluoroéthanol (TFE), qui est un solvant très polaire pouvant former des liens hydrogène
- le méthanol, qui est un solvant de polarité intermédiaire pouvant également former des liens hydrogène
- le 1,2-dichloroéthane, qui est très apolaire et incapable de former des liens hydrogène, pourra nous donner des informations sur les conformations des peptides dans les milieux très hydrophobes, comme le sont les membranes.

Les résultats sont représentés dans la Figure 26. Nous pouvons noter que quel que soit le solvant, **29** adopte une conformation préférentielle d'hélice  $\alpha$ . Il est intéressant de relever que c'est dans le TFE (Figure 26a), solvant reconnu comme étant fort donneur de liens hydrogène, que le minimum à 221 nm est le moins intense. Ceci serait révélateur d'une teneur moins élevée en structure hélicoïdale (47). Par contre, dans deux solvants aussi différents que le méthanol (polaire et protique) et le DCE (apolaire et aprotique), **29** adopte une conformation d'hélice  $\alpha$  quasi identique.

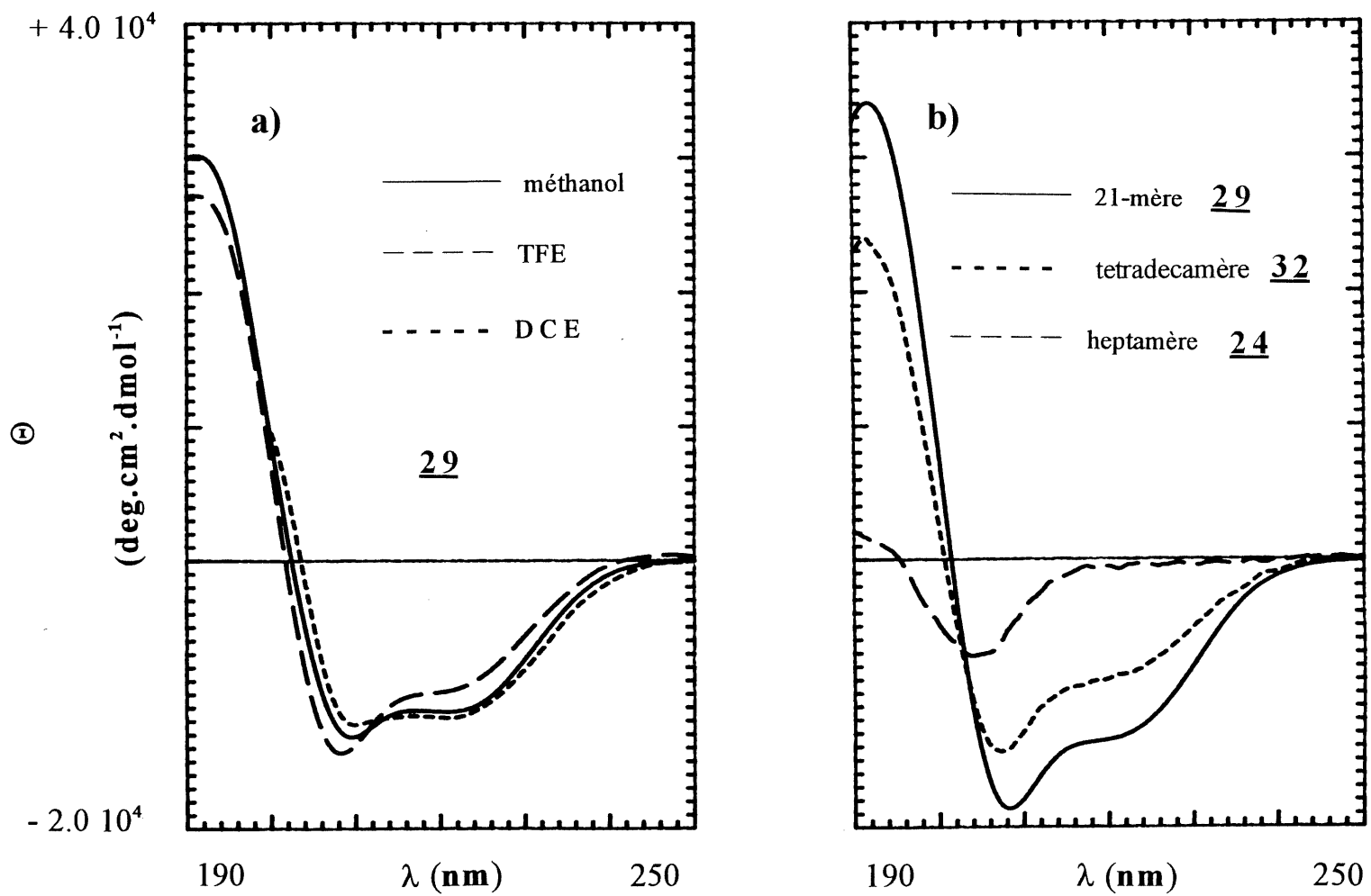
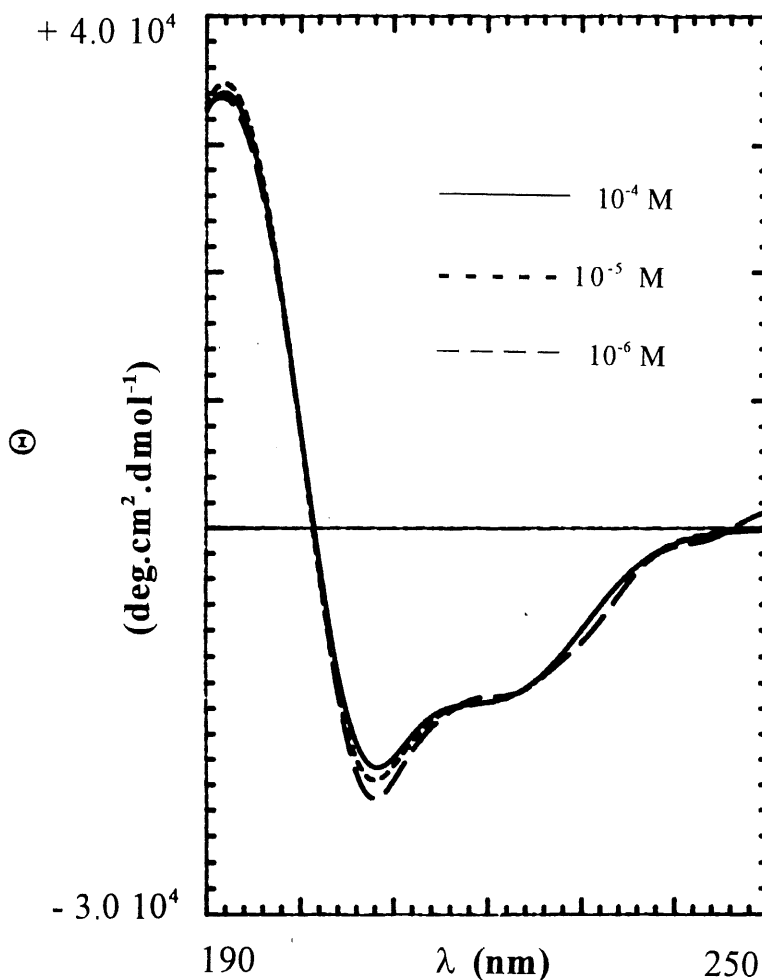


Figure 26. Études conformationnelles des modèles en solution par DC

Par comparaison, ses homologues de taille plus réduite (Figure 26b) présentent un caractère d'hélice  $\alpha$  moins prononcé (tetradecamère 32) ou adoptent une conformation désorganisée (heptamère 24) dans le TFE. Dans ce dernier cas, les couronnes ne sont vraisemblablement pas alignées.



**Figure 27.** Études de DC sur 29 à concentration variable dans le TFE

Nous avons également étudié 29 par DC à concentration variable (Figure 27). Même en diluant d'un facteur 100 la solution initiale (c'est la limite pour obtenir un signal observable), nous obtenons des courbes superposables. La

non-altération des courbes, après dilution, donne une bonne indication que ce peptide ne forme pas d'agrégat dans les solvants organiques.

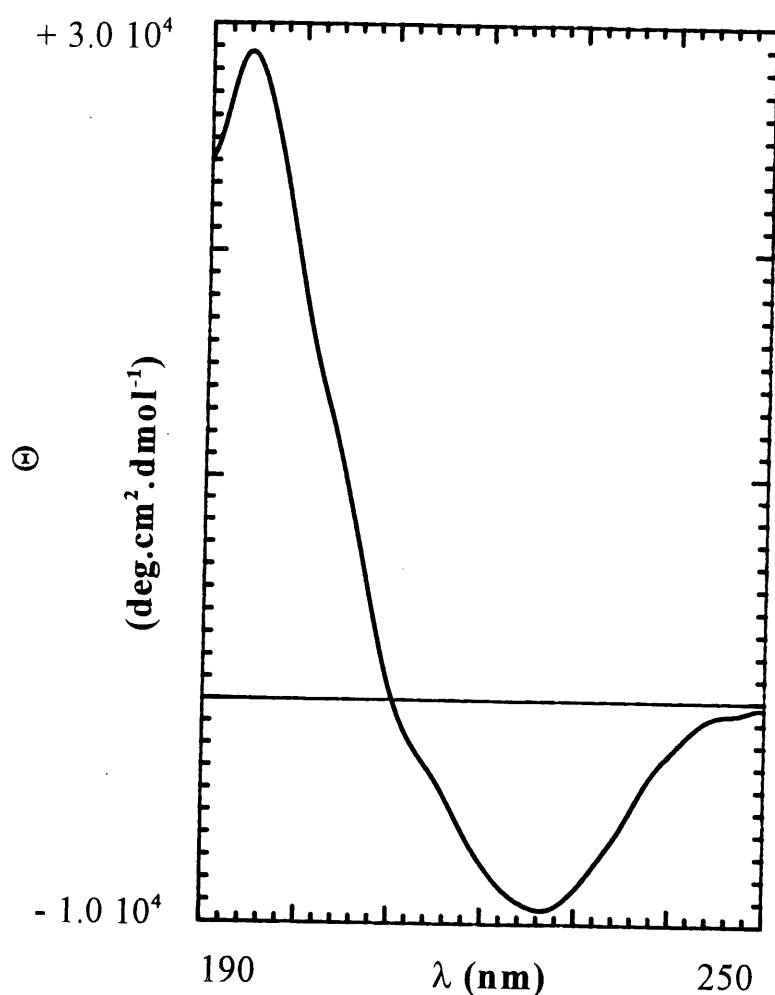
En conclusion, nous dirons que **29** adopte très préférentiellement une conformation d'hélice  $\alpha$  dans les solvants organiques. De plus, ce peptide ne présente pas de signe d'agrégation en solution. Néanmoins, sa structure secondaire semble subir de légères altérations dans les solvants très donneurs de liens hydrogène, comme le TFE. Enfin, un nombre d'acides aminés supérieur à 7 est nécessaire pour observer un début d'organisation hélicoïdale.

Ces observations ont été faites avec tous les autres peptides de 21 acides aminés que nous avons produits (*cf.* annexe 3). Ceci met en évidence le peu d'influence de la taille de la couronne ou de la nature des têtes polaires, quant à l'organisation structurale du squelette peptidique.

### 2.2.3 Études de spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire dans des bicouches lipidiques

Pour obtenir des informations structurales sur **29** dans un milieu plus représentatif de la nature d'une membrane lipidique que ne le sont les solvants organiques, nous avons mené des études de DC dans des bicouches lipidiques.

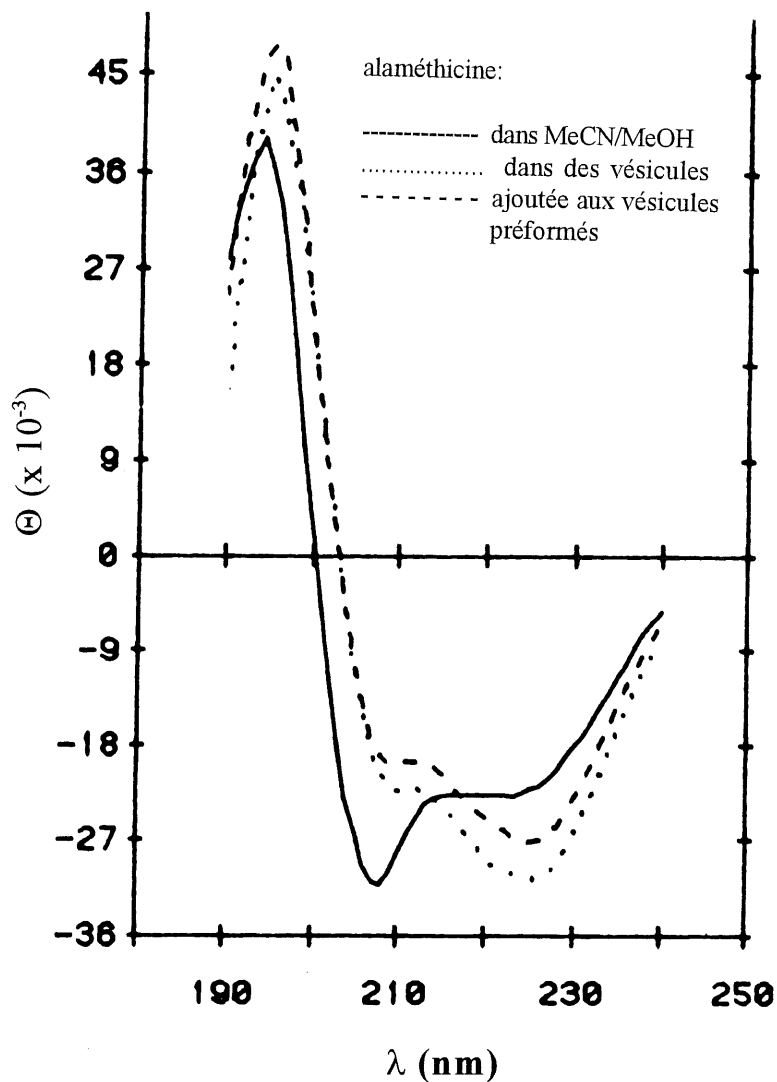
Nous avons préparé des petits vésicules unilamellaires à partir de lécithines de jaune d'oeuf, par sonication d'une suspension aqueuse des lipides (10a). Le peptide **29**, dans un ratio molaire lipide/peptide de 80:1, ne peut être incorporé dans ces vésicules que s'il est mélangé aux lipides avant la préparation des vésicules. Le résultat des mesures est représenté dans la Figure 28.



**Figure 28.** Études de DC sur 29 dans des vésicules

Nous pouvons immédiatement noter un important changement de la courbe DC de 29 par rapport à celles obtenues dans des solvants organiques. En fait, ces courbes présentent une grande analogie avec celles obtenues lors d'une étude sur la conformation de l'alaméthicine (Figure 29), menée par Cascio et Wallace (51). Ce peptide, qui possède une activité de canal ionique, adopte en solution dans un mélange acétonitrile/méthanol, une structure hélicoïdale semblable à celle de 29 dans le TFE. Les auteurs estiment que dans

ce solvant, 45 % du peptide est en conformation d'hélice  $\alpha$ . Mais aussitôt introduit dans des vésicules, sa conformation change et ici encore, est similaire à ce qui est observé dans le cas de **29**. Sa teneur en hélice  $\alpha$  n'est alors plus que de 35 %, avec une apparition de peptides organisés en feuillet  $\beta$ . Mais cette dernière structure serait en fait révélatrice d'un phénomène d'agrégation.



**Figure 29.** Étude de DC sur l'alaméthicine réalisée par Cascio et Wallace (51)

Donc, les indications d'altération conformationnelles produites sur **29** par les solvants très polaires semblent se confirmer. L'eau provoquerait une agrégation de ce peptide très hydrophobe, qui se matérialiserait par l'observation d'un signal associé à des structures de feuillet  $\beta$  mais qui serait plutôt révélateur d'une désorganisation de la conformation hélicoïdale.

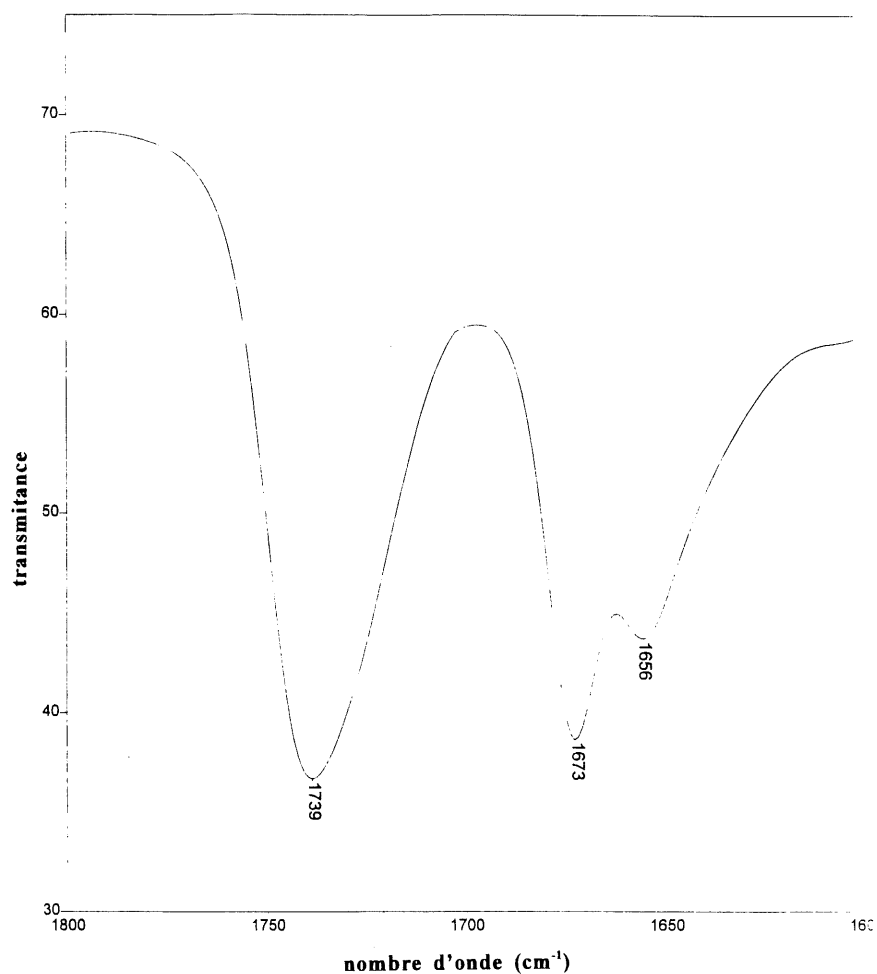
### 2.3 Études conformationnelles par spectroscopie infrarouge

Dans le but de confirmer les premières informations données par le DC, nous avons utilisé une autre technique spectroscopique qui permet de donner des renseignements quant à la structure secondaire des peptides: le FT-IR.

C'est l'absorbance des carbonyles du peptide, dans la bande 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  (bande amide I), qui nous fournit cette information. Celle-ci correspond à l'étirement du lien  $\text{C}=\text{O}$  (52).

Nous avons préparé des bicouches lipidiques avec de la dipalmitoylglycérol phosphocholine (DPPC) en suspension dans de l'eau deutériée ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Le peptide **29** a été préalablement mixé aux lipides comme dans le cas des études de DC, de façon à avoir un ratio lipide/peptide de 10:1. Le mélange a été chauffé plusieurs fois au dessus de la température de transition du lipide, puis refroidi, afin d'assurer une bonne incorporation du peptide dans la bicouche. Les mesures ont été effectuées sur pastille de fluorure de calcium. Les résultats obtenus sont indiqués dans la Figure 30. Nous notons la présence de deux bandes amide I. Une importante à 1673  $\text{cm}^{-1}$  est indicative d'une structure désorganisée. Celle à 1656  $\text{cm}^{-1}$  est quant à elle caractéristique d'une organisation en hélice  $\alpha$  (53). La bande à 1739  $\text{cm}^{-1}$  est attribuable aux carbonyles des liens ester dans les phospholipides.





**Figure 30.** Étude en FT-IR de 29 dans des bicouches lipidiques

Encore une fois, nous obtenons une indication de la tendance qu'a 29 à s'agréger en présence d'eau. Nous ne notons cependant pas de bande à 1610-1628 cm<sup>-1</sup> qui caractériserait une organisation en feuillet  $\beta$  (54). La perte de caractère hélicoïdal, observée lors des études DC dans des vésicules, semble effectivement due à une orientation vers des structures aléatoires, sous l'effet d'un phénomène d'agrégation du peptide.

## 2.4 Conclusion

Les études conformationnelles ont démontré que les peptides à 21 acides aminés adoptent préférentiellement une structure d'hélice  $\alpha$  dans plusieurs média de polarité différente. Ceci était un prérequis imposé pour que la molécule se comporte conformément à notre plan. Néanmoins, mis en présence de solvants très polaires, le peptide **29** perd une partie de son caractère hélicoïdal, comme dans le TFE, et a même tendance à s'agréger dans une conformation aléatoire, en présence d'eau. Ceci ne lui permet plus d'aligner ses couronnes dans l'espace, pour former le tunnel polaire désiré. Cependant, une certaine proportion du peptide restant en conformation d'hélice  $\alpha$ , nous pouvons espérer l'observation d'une activité d'ionophore. Cet espoir étant corroboré par la structure très hélicoïdale adoptée par **29** dans un solvant comme le DCE, de polarité similaire à celle du coeur aliphatique d'une membrane.

## CHAPITRE 3

### ÉTUDES D'ACTIVITÉ ET MÉCANISME D'ACTION DES MODÈLES

#### 3.1 Préambule

Après avoir caractérisé la conformation adoptée par les peptides suivant leur environnement, il nous reste à tester leur activité potentielle, ainsi qu'à interpréter un mode d'action compatible avec les données observées.

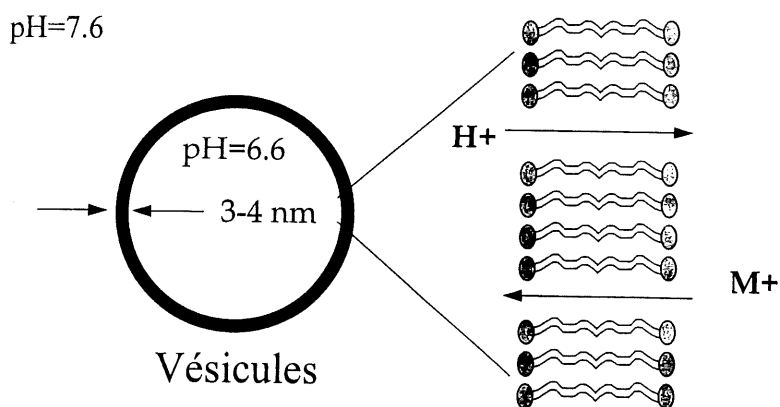
Nous avons eu recours à trois techniques différentes fréquemment utilisées lors de la caractérisation de canaux ioniques, ainsi qu'à une série de tests biologiques.

#### 3.2 Mesure du transport de cations par la méthode de « pH-stat »

Cette étude a été effectuée par Voyer et Robitaille (55) préalablement à ce travail, et publiée.

La technique de pH-stat a été mise au point par Lehn *et al.* (56) et reprise par le groupe de Fyles (57). Elle consiste à préparer de petits vésicules unilamellaires (tels que décrits en 2.2.3) dans un tampon à pH = 6.6. Ces vésicules sont ensuite transvasés dans une solution à pH = 7.6 d'un sel du métal

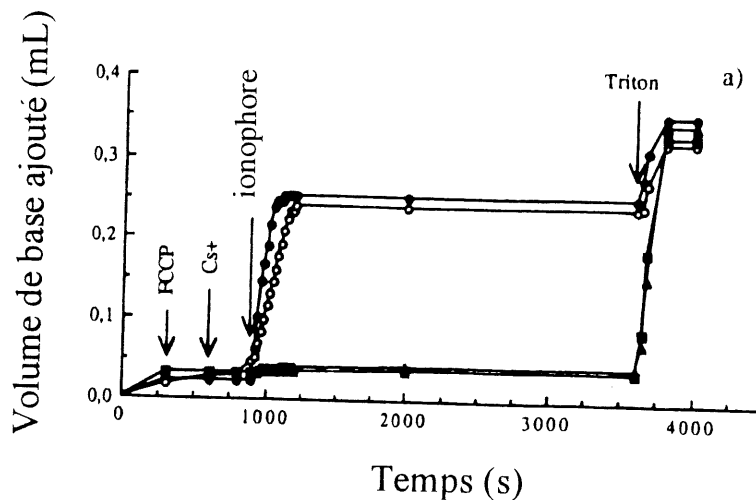
alcalin étudié. On crée par là même un gradient de pH de l'intérieur vers l'extérieur des vésicules, ainsi qu'un gradient d'ions métalliques en sens inverse (Figure 31).



**Figure 31.** Représentation schématique de l'antiport proton/cation métallique observé dans des conditions de « pH-stat »

On additionne par la suite un transporteur de protons qui s'incorpore dans les membranes, le cyanure de carbonyl 4-(trifluorométhoxy)-phénylhydrazone (FCCP). Malgré cela, les protons ne peuvent pas sortir des vésicules en raison de la nécessité de préservation de la neutralité électrique. C'est alors que l'on ajoute l'ionophore testé. S'il est efficace, il permet aux ions métalliques d'entrer et ceci a pour conséquence un efflux de protons des vésicules, par mécanisme d'antiport, qui fait chuter le pH de la solution. On additionne une solution basique de façon à maintenir le pH à sa valeur initiale; d'où le nom de « pH-stat ». Par simple mesure du volume de base ajouté, on détermine le potentiel ionophore du composé testé. A la fin de l'expérience, on ajoute un détergent (ici, le Triton X100). Ceci doit se traduire par un efflux de protons supplémentaire, produit par la destruction des vésicules, et

permet de vérifier que le composé testé est bien un ionophore, et non un détergent lui-même.



**Figure 32.** Étude du pouvoir ionophore de 29 par la méthode de « pH-stat ». (▲) 18; (■) Peptide 24; (●) Peptide 29; (○) Gramicidine A

Les résultats obtenus avec les peptides 21-mère 29 et heptamère 24, ainsi qu'avec le monomère BOC-ECV-OMe 18, dans une expérience de transport du césium sont représentés dans la Figure 32. Nos composés sont comparés à la gramicidine A. Ils permettent de mettre en évidence que le modèle 29 a un comportement d'ionophore similaire à celui du canal ionique naturel. L'addition du peptide 29 s'accompagne d'un rapide relargage de protons des vésicules. Au contraire, les deux molécules servant de contrôle, dont l'homologue heptapeptide 24, s'avèrent inefficaces. Il est à noter que l'ordre d'addition des composés n'a pas d'influence sur les résultats obtenus. Le plateau observé, qui correspond à la libération d'environ 80 % des protons enfermés dans les vésicules, s'explique par la possibilité de trouver des vésicules multilamellaires dans la solution. Lors de l'addition du Triton, on

note que la destruction des vésicules se matérialise par une libération de protons supplémentaire. Ceci permet de vérifier que **29** n'a pas détruit les vésicules.

Cette expérience met en évidence le pouvoir ionophore de **29**, mais ne permet pas de démontrer son activité de canal ionique. Un transporteur, comme la valinomycine, voire un destructeur de bicouches, comme la mélittine, peuvent également conduire à de tels résultats.

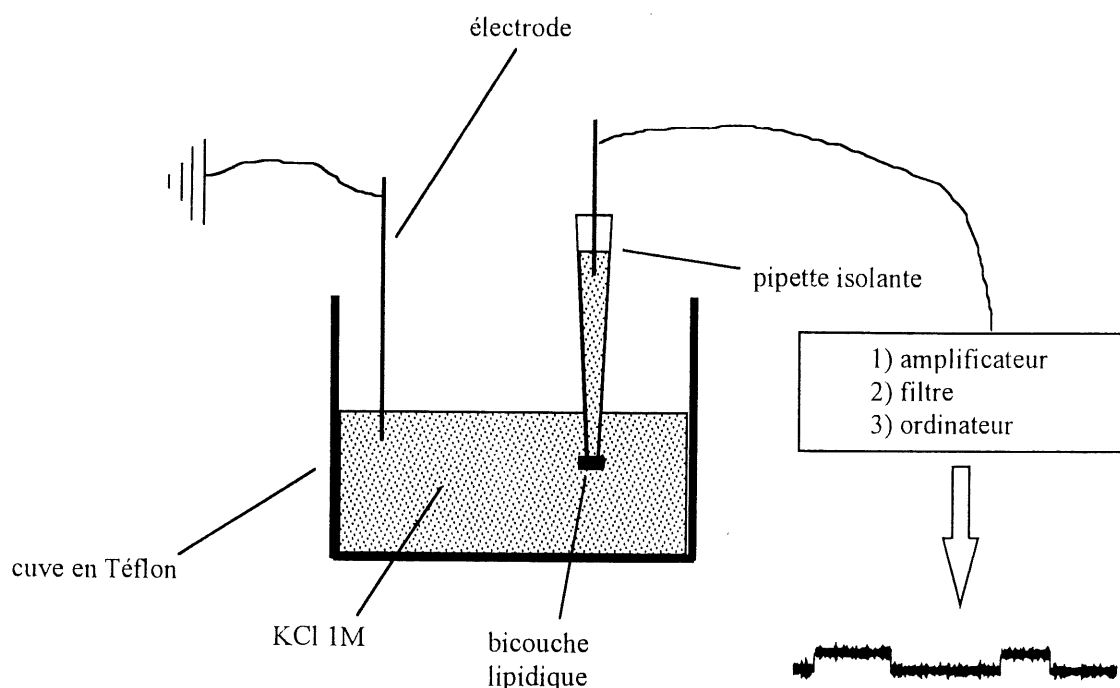
Il reste à déterminer par quel mécanisme le peptide conduit les ions. Ceci est possible par la mesure de conductivité monomoléculaire.

### **3.3 Mesures de conductivité monomoléculaire**

#### **3.3.1 La méthode de « *patch clamp* »**

Il existe une technique permettant de déterminer si un ionophore possède une activité de canal ionique: c'est la mesure de conductivité monomoléculaire (1,58). Cette technique, mieux connue sous l'appellation de « *patch clamp* », a été décrite par le groupe de Montal (59). Elle consiste en la formation d'une bicouche lipidique sur l'embout d'une pipette isolante (Figure 33). La pipette est plongée dans une cuve en Téflon, remplie d'une solution à concentration précise d'un sel du cation étudié, dans laquelle est plongée une électrode à Ag/AgCl. La pipette elle-même est remplie de la même solution, dans laquelle trempe également une électrode. Le système est connecté à un appareillage à *patch clamp* (amplificateur, filtre et ordinateur) servant à traiter les données. Si l'on applique une différence de potentiel entre les deux électrodes, une

infime quantité de courant sera détectée, vu le caractère non-conducteur de la bicouche. Sur le graphique, ceci correspond à la ligne de base.



**Figure 33.** Représentation schématique du montage utilisé lors des mesures de conductivité monomoléculaire par la méthode de « *patch clamp* »

Mais si l'on ajoute dans la cuve un aliquot d'une solution de l'ionophore étudié, celui-ci peut s'incorporer dans la membrane et permettre le passage des ions. Ceci s'accompagne de la détection d'une quantité discrète de courant. La conductivité d'une seule molécule peut ainsi être mesurée. Toute incorporation d'une molécule active supplémentaire, dans une conformation « ouverte », se traduira par une augmentation discrète, de même intensité, du

courant détecté. Ce phénomène monomoléculaire se traduit sur le graphique par l'apparition de paliers caractéristiques (en « marche d'escalier »), qui correspondent à la conductivité du canal ionique dans sa forme « ouverte ». Chaque « fermeture » d'un canal se traduisant, au niveau graphique, par un abaissement d'une marche.

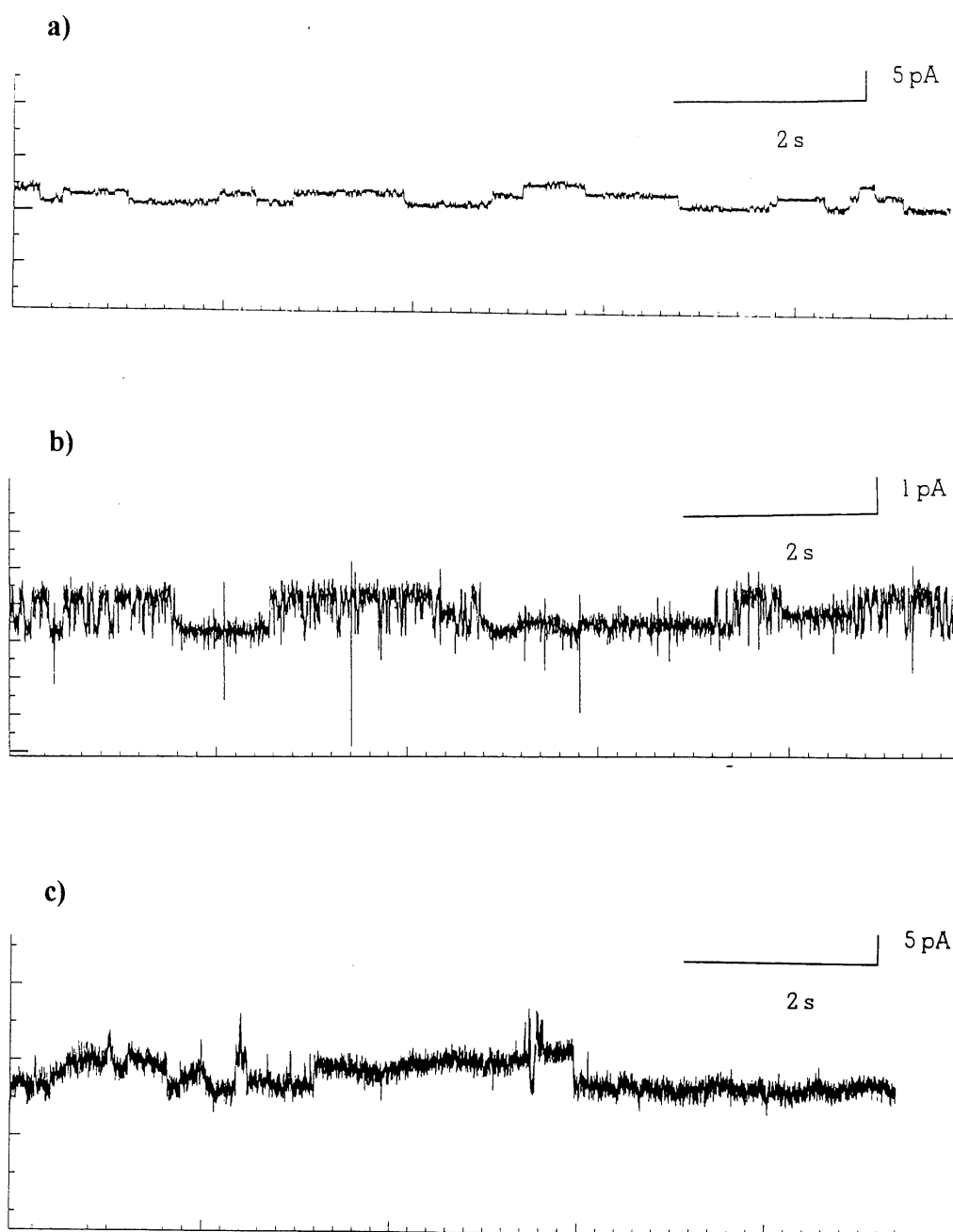
Pour un cation donné, présent à une concentration donnée, et dans un même type de bicouche lipidique, un canal ionique possède une conductivité moléculaire fixe. Il s'agit en fait d'une « empreinte digitale » du composé.

### 3.3.2 Études de conductivité monomoléculaire sur les modèles

Nous avons soumis nos peptides à des études de conductivité par la méthode de « patch clamp ». Le cation étudié a été le potassium. Nous avons opéré selon deux approches différentes: 1) le peptide en solution dans le méthanol a été introduit dans la cuve, la bicouche lipidique ayant été préalablement formée sur l'embout de pipette 2) le peptide a été mélangé aux lipides et la bicouche préparée à l'aide de ce mélange. Nous avons utilisé deux types de lipides. A savoir, la diphytanoylglycérol phosphocholine (DiPhy) qui est un lipide zwitterionique et le monooléate de glycérol (GMO) qui est un lipide non chargé.

Les résultats obtenus n'ont pas été très satisfaisants. Il s'est avéré très difficile d'obtenir des signaux caractéristiques de canaux ioniques sur une longue période et de façon suffisamment fréquente, conditions qui s'avéraient nécessaires à la détermination de la conductivité des molécules.





**Figure 34.** Conductivité des bicouches lipidiques mesurée en présence de 29 par la méthode de « *patch clamp* » a) signal associable à la présence d'un canal ionique dans la DiPhy b) même cas, dans le GMO c) conductivité aléatoire dans la DiPhy

Lorsqu'additionnés directement dans la cuve, les peptides formaient immédiatement un précipité blanc révélateur de leur forte tendance à s'agréger en présence d'eau. Néanmoins, le peptide **29** nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans la Figure 34. Les deux enregistrements ont été obtenus lorsque la bicouche était formée avec le mélange lipide-peptide, avec une différence de potentiel de +100 mV. Dans le DiPhy, le courant détecté possède une intensité de 3.5 pA, alors qu'elle est de 1.0 pA dans le GMO. Cependant, la présence du peptide gêne énormément la préparation d'une bicouche stable, ce qui est un prérequis pour obtenir une ligne de base et pouvoir produire des résultats significatifs. Il s'est donc avéré impossible de faire des études de variation de voltage pour pouvoir déterminer la conductivité propre.

La plupart du temps, si les peptides étaient directement ajoutés dans la cuve, nous ne notions aucune altération de la ligne de base. Ceci révèle qu'ils ne s'adsorbaient même pas sur les lipides. Et dans le cas des bicouches préparées avec le mélange lipide-peptide, nous notions des variations de conductivité très aléatoires (Figure 34c) et possédant parfois de très grandes amplitudes (des intensités proches de 50 pA furent enregistrées, toujours à +100 mV). Dans ce dernier cas, il s'est parfois avéré ardu de distinguer les signaux de conductivité de ceux relevant d'une simple altération mécanique de la stabilité des membranes.

Les conclusions tirées de ces études sont que seul le peptide **29** a donné des signes encourageants d'activité de canal ionique monomoléculaire. Ceci s'est traduit par l'observation de courants en « marche d'escalier », très caractéristiques. Néanmoins, le peu de reproductibilité obtenue au niveau de

l'intensité de ces courants pourrait confirmer la tendance qu'a le peptide à produire divers types d'agrégats en présence d'eau; chacun de ces derniers possédant une conductivité propre. Dans ces derniers cas, nous serions plus proches d'une action de pore, de type melittine, que de canal ionique.

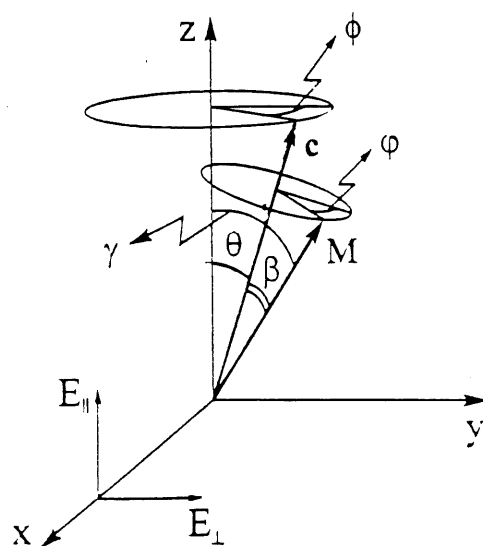
Notons enfin, que le peptide **29**, qui s'avère le plus actif, ne possède pas de tête polaire. Or, l'activité de canal ionique implique une orientation précise dans la bicouche lipidique. Cette orientation est normalement due à la présence de groupements polaires aux extrémités du composé. Le peptide **29**, dépourvu de ces groupements, peut-il s'orienter convenablement dans la membrane ? Nous allons tenter de répondre à cette interrogation par une technique de FT-IR: la réflexion totale atténuée.

### **3.4 Études d'orientation du modèle dans les bicouches lipidiques par réflexion totale atténuée**

#### **3.4.1 La méthode de réflexion totale atténuée**

La spectroscopie infrarouge peut être utilisée dans le but de mesurer l'orientation moléculaire en phase gel ou cristal liquide. La théorie physique sur laquelle est basée cette technique repose sur la détermination d'un paramètre d'ordre, noté  $\langle P_2 \rangle$  (60).

La Figure 35 représente une chaîne moléculaire  $c$ , inclinée d'un angle  $\theta$  selon une référence  $z$ .  $M$  correspond au moment de transition du composé et  $\beta$  à l'angle d'inclinaison de  $M$  par rapport à la chaîne.



**Figure 35.** Représentation théorique de la mesure de l'orientation moléculaire par spectroscopie infrarouge

Le principe consiste à mesurer le rapport dichroïque  $R$  obtenu lors de mesures infrarouge en lumière polarisée perpendiculairement ( $E_{\perp}$ ) puis parallèlement ( $E_{\parallel}$ ). La valeur de  $R$  est le rapport des valeurs d'absorbance donné par l'équation (1) et l'on peut mesurer l'orientation grâce à l'équation (2)

$$R = A_{\parallel}/A_{\perp} \quad (1)$$

$$\langle P_2 \cos \theta \rangle = \frac{R - 2}{(R + 1.45) \langle P_2 \cos \beta \rangle} \quad (2)$$

La réflexion totale atténuée (ATR) consiste à effectuer les mesures FT-IR après avoir déposé l'échantillon sur un monocristal de germanium. L'utilisation de ce métal, qui possède un indice de réfraction très élevé, permet de maximiser le signal mesuré. Cette technique est souvent utilisée pour mesurer l'orientation de macromolécules transmembranaires dans des bicouches lipidiques (61).

Dans le cas de l'étude d'une protéine, il est nécessaire de connaître sa structure secondaire de façon à pouvoir approximer la valeur de l'angle  $\beta$ . Le chromophore étudié est ici la bande amide I et, dans le cas d'une hélice  $\alpha$ , la valeur de référence pour  $\beta$  est  $27^\circ$ . Si l'on mesure l'orientation de la protéine dans une bicouche lipidique, on aura également la possibilité de déterminer l'orientation des lipides et les orientations relatives des composés. Le chromophore utile dans le cas des lipides est l'élongation symétrique des liens C-H<sub>2</sub> à  $2850\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.4.2 Études sur le peptide **29**

Notre peptide **29** a été mélangé avec de la DPPC ou de la dimyristoylglycérol phosphocholine (DMPC) dans un ratio molaire lipide:peptide de 30:1. Nous avons mis le mélange en suspension dans de l'eau deutériée de manière à préparer les bicouches lipidiques. La suspension a été étendue sur le cristal de germanium à ATR et les mesures effectuées. Nous avons considéré que notre peptide adoptait une conformation d'hélice  $\alpha$  et donc la valeur de l'angle  $\beta$  a été fixée à  $27^\circ$ . Les résultats sont rapportés dans le Tableau 2.

**Tableau 2.** Études d'orientation du peptide **29** dans des bicouches lipidiques par ATR

Composé	Bande étudiée	Angle $\beta$	Rapport dichroïque (R)	Orientation
<b>29</b> (dans DMPC)	1657 cm <sup>-1</sup>	27°	1.99	aucune
<b>29</b> (dans DPPC)	1657 cm <sup>-1</sup>	27°	2.01	aucune
<b>DMPC</b>	2850 cm <sup>-1</sup>	90°	0.94	15°
<b>DPPC</b>	2850 cm <sup>-1</sup>	90°	0.96	17°

Les résultats observés peuvent permettre d'expliquer une partie de nos difficultés à obtenir des signaux de conductivité monomoléculaire. Le peptide **29** a le comportement d'un composé isotrope, indicatif d'une absence totale d'orientation dans les bicouches lipidiques.

Cette observation était tout de même prévisible, vu que l'absence de tête polaire ne prédispose pas **29** à une orientation parallèle aux lipides au sein d'une bicouche, au contraire de la gramicidine A, par exemple. Néanmoins, s'agissant d'une molécule amphiphile, nous étions en droit d'attendre une quelconque orientation dans un milieu amphipathique. Éventuellement, nous pouvions même redouter une incorporation du peptide perpendiculairement aux lipides, de par d'éventuelles interactions entre les éthers-couronne et les groupements chargés des lipides. Mais ceci aurait eu pour conséquence la mesure d'un angle d'orientation proche de 90°.

### 3.5 Études d'évaluation de l'activité biologique

#### 3.5.1 Activité bactériostatique

Les modèles de canaux ioniques naturels simples décrits dans ce travail ayant une activité antibiotique, nous avons décidé d'étudier la toxicité de nos modèles sur diverses souches bactériennes. Les organismes choisis sont sensibles à la gramicidine ou non, et ce composé a servi de référence.

Le principe de l'expérimentation consiste à inoculer des solutions, à diverses concentrations, des composés testés à des cultures bactériennes. Après 24 heures d'incubation, on détermine la plus petite concentration de composé qui inhibe la croissance bactérienne.

Malheureusement, aucun de nos peptides ne s'est avéré efficace sur les onze souches sur lesquelles ils ont été testés. En effet, la croissance des souches sensibles à la gramicidine, comme *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae*, est inhibée à des concentrations d'antibiotique de l'ordre de 1 µg/mL. Les concentrations efficaces de nos peptides sont de l'ordre de 200 µg/mL, ce qui est interprété comme une résistance de la bactérie au composé.

Cependant, une remarque doit être faite au sujet de la solubilité des produits. Il s'est avéré très difficile de mettre en solution les peptides testés. L'adjonction de 2 % de DMSO ou de 4 % de méthanol n'a pas empêché ceux-ci de former un précipité lorsqu'introduits dans le milieu de culture, de sorte que les concentrations efficaces sont vraisemblablement très exagérées.

### 3.5.2 Cytotoxicité envers les cellules eucaryotes

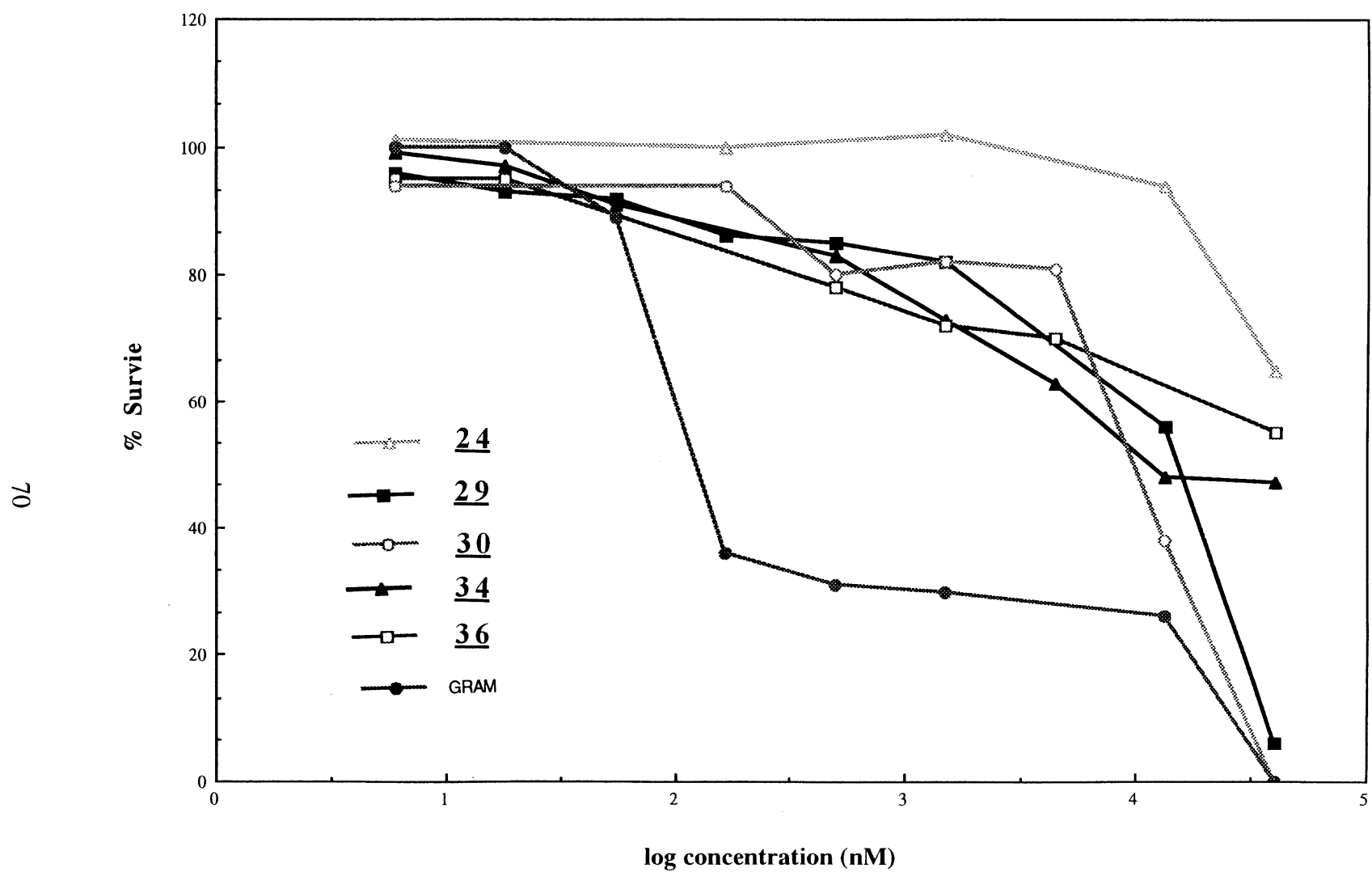
Nos résultats les plus prometteurs ont été obtenus avec les cellules eucaryotes. Nous avons testé l'activité cytotoxique de nos peptides sur deux lignées de cellules cancéreuses: une lignée de cellules de cancer du sein (MDA) et une lignée de cellules de leucémie de souris (P388).

Le principe repose sur la préparation d'une culture des cellules étudiées puis, à la dilution de ces cultures de manière à obtenir un nombre connu de cellules par unité de volume. Des solutions, à diverses concentrations, des composés testés sont préparées et mises au contact des cellules. Après 3 jours d'incubation, on procède au comptage des cellules survivantes après coloration chimique. Chaque essai (lignée/composé/concentration donnés) est effectué six fois et l'expérience au complet a été reprise une fois. Ceci permet la détermination de la dose létale moyenne ( $DL_{50}$ ) pour chaque composé.

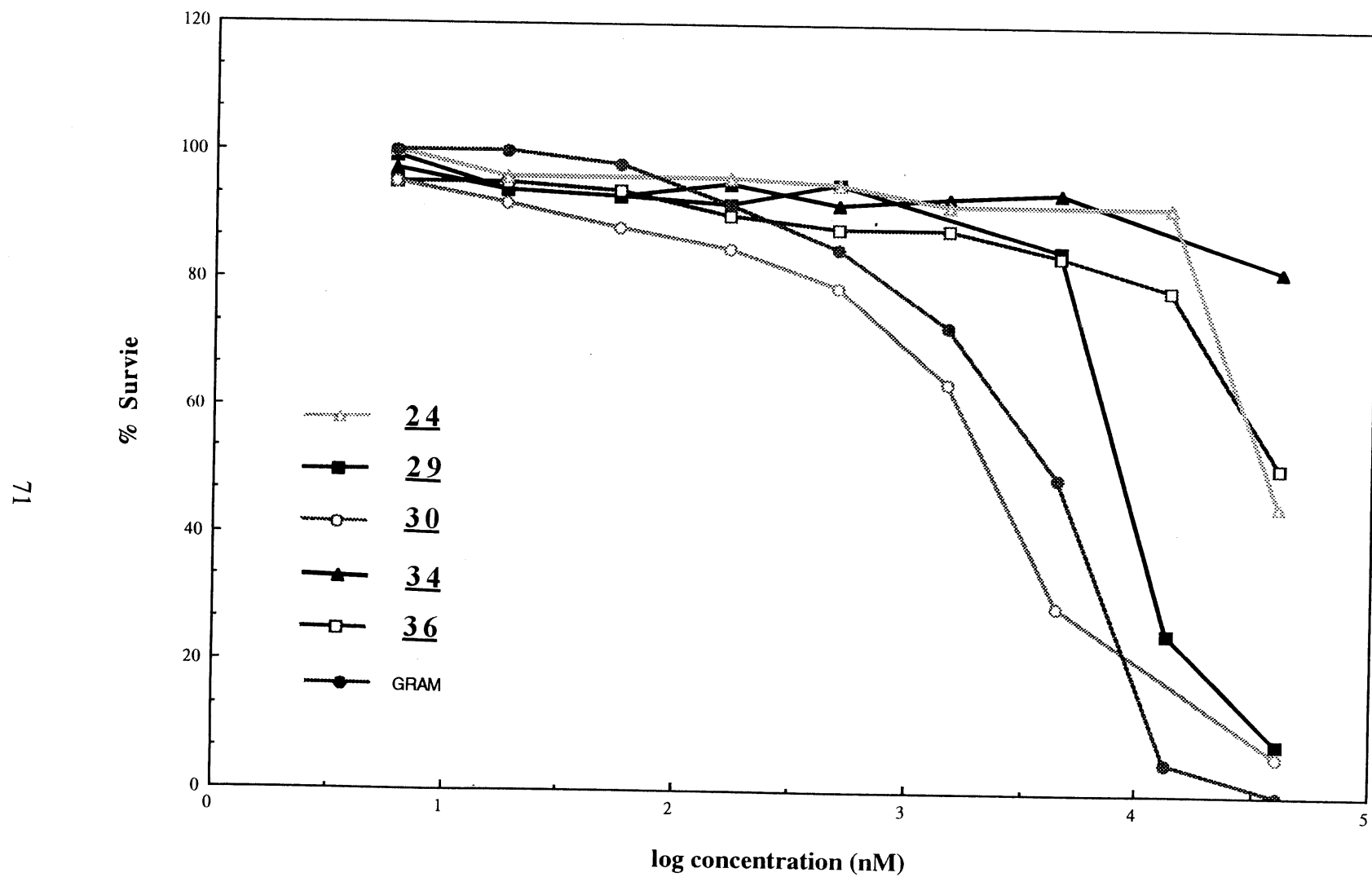
Les Figures 36 et 37 montrent les résultats obtenus avec les peptides diprotégés **24**, **29** et **30**, ainsi qu'avec les peptides déprotégés **34** et **36**. Une expérience de contrôle (non représentée sur les figures) a également été menée avec le monomère BOC-ECV-OH **14**. Pour pouvoir procéder à des comparaisons, les concentrations effectives de **24** et **14** sont en fait 2 fois et 6 fois plus élevées, respectivement. Ceci assure que le même nombre de couronnes soit mis en oeuvre lors de chaque essai. La gramicidine a servi ici encore de référence.

Deux peptides démontrent une activité très intéressante et ce, envers les deux lignées de cellules cancéreuses. Il s'agit des peptides diprotégés à 21 acides aminés **29** et **30**. Ces deux homologues sont construits avec le 21-couronne-7 et le 15-couronne-5, respectivement.





**Figure 36.** Évaluation de la cytotoxicité de divers modèles de canal ionique sur les cellules de cancer du sein MDA



**Figure 37.** Évaluation de la cytotoxicité de divers modèles de canal ionique sur les cellules de leucémie de souris P388

Nous notons que les cellules sont très peu sensibles à **24** et pas du tout à **14**, ce qui semble démontrer l'importance de la longueur du peptide. L'inefficacité des deux autres peptides plus polaires **34** et **36** pourrait s'expliquer par une interaction différente avec la membrane. Les groupements chargés présents sur ces deux peptides empêchent peut-être ceux-ci de pénétrer dans la bicouche lipidique.

Le Tableau 3 résume les valeurs approximatives des  $DL_{50}$  pour les composés testés.

**Tableau 3.** Valeur des  $DL_{50}$  pour les composés testés sur les lignées de cellules cancéreuses.

Composé	Nom	MDA $DL_{50}$ ( $\mu$ M)	P388 $DL_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>14</b>	BOC-ECV-OH	ND	ND
<b>24</b>	BOC-Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu-OMe	ND	35*
<b>29</b>	BOC-(Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu) <sub>3</sub> -OMe	15	8.5
<b>30</b>	BOC-(Leu-ECQ-Leu <sub>3</sub> -ECQ-Leu) <sub>3</sub> -OMe	10	2.5
<b>34</b>	H-(Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu) <sub>3</sub> -EDA	15*	ND
<b>36</b>	Pyr-(Leu-ECV-Leu <sub>3</sub> -ECV-Leu) <sub>3</sub> -OH	> 30	> 40
<b>GRAM</b>	Gramicidine	0.2	4.0

(\*) La  $DL_{50}$  est atteinte mais ces composés n'ont pas tué toutes les cellules dans la gamme de concentrations étudiée. (ND) Non déterminable.

Les valeurs de  $DL_{50}$  obtenues, de l'ordre de 10  $\mu M$ , sont intéressantes pour un composé anticancéreux, à la condition que celui-ci ne soit pas toxique. A ce propos, nous pouvons relever que les monomères constituant les peptides, dont **14**, se sont avérés non cytotoxiques. L'activité des peptides **29** et **30** se compare assez bien à celle de la gramicidine dont la toxicité est, par contre, bien connue.

Mais cette fois encore, nous avons noté un problème de solubilité pour nos molécules. Celui-ci ne fait que renforcer l'intérêt des résultats obtenus, les concentrations effectives de nos peptides étant très vraisemblablement plus faibles que celles calculées. Il y aurait certainement un intérêt à mettre ces composés en solution dans de l'huile d'olive ou à les mêler à des suspensions de liposomes.

Ces tests ne sont cependant pas révélateurs d'une activité de canal ionique. L'activité des composés pourrait être le résultat d'un tout autre mécanisme d'action, membranaire ou non. Cependant, la comparaison avec les molécules de contrôle laisse assez peu de place à d'autres hypothèses.

### **3.6 Modèle d'activité proposé - conclusion**

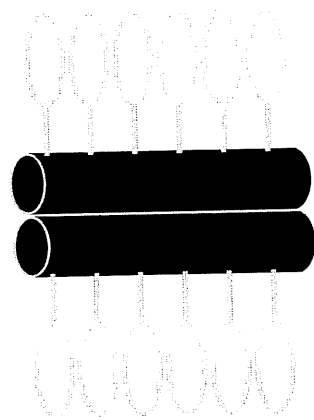
A la lumière des résultats obtenus lors des diverses études effectuées sur nos modèles, nous pouvons élaborer quelques hypothèses plausibles, à défaut de conclusions définitives.

Les études conformationnelles ayant mis en évidence la grande hydrophobie de nos peptides et, plus important, le pouvoir déstructurant que semble avoir la présence d'eau sur ceux-ci, nous pouvons attribuer l'essentiel

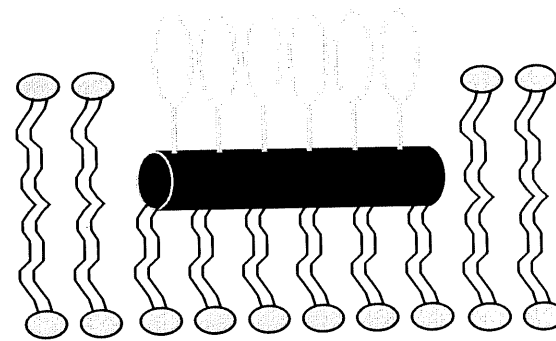
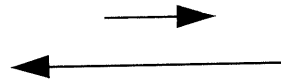
des aspects négatifs des résultats obtenus à un phénomène important d'agrégation des composés en milieu aqueux. Celui-ci se traduit par une perte de la conformation hélicoïdale, vraisemblablement active, voire même par une précipitation. Néanmoins, un potentiel d'activité reste indéniable au vu des résultats de « patch clamp », de pH stat et d'essais biologiques. Il a été démontré que ces résultats n'étaient pas le fait d'artefacts par nos nombreuses expériences de contrôle, notamment avec le peptide sans couronne **31** et avec l'heptapeptide **24**.

Curieusement, les meilleurs modèles, **29** et **30**, sont dépourvus de têtes polaires. Ceci s'explique peut-être par notre choix de groupements chargés à pH physiologique dans le cas de **34** et **36**, qui rendraient impossible la pénétration de ces peptides dans la bicouche lipidique. D'un autre côté, les composés actifs posséderaient quant à eux la faculté de pénétrer dans la membrane mais, l'absence de groupement terminal polaire leur empêcherait de s'orienter préférentiellement dans la bicouche lipidique, comme l'indique l'étude d'ATR menée sur **29**. Cet aspect de leur comportement limiterait grandement leur activité. Nous avons schématisé dans la Figure 38 un modèle proposé pour l'activité de ces deux peptides.

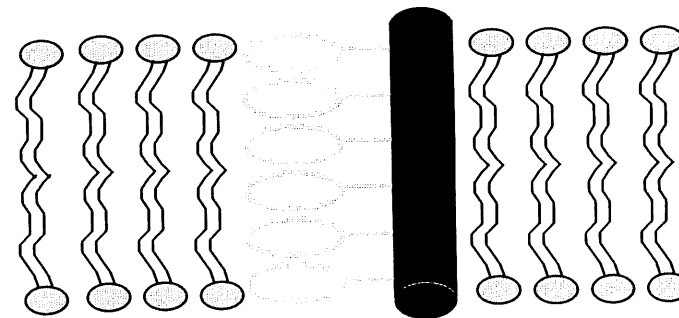
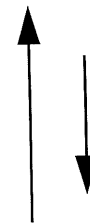
Ce modèle d'activité s'appuie sur les hypothèses émises par DeGrado *et al.* pour leurs modèles de canaux ioniques peptidiques (10a). Dans leur cas, une certaine agrégation était souhaitée de façon à constituer un pore polaire, de type amphotéricine. Néanmoins, ils ont constaté que leurs peptides, des polyleucines de même nature que les nôtres, présentaient des niveaux d'agrégation très élevés en milieu aqueux.



**Forme agrégée**



**A**



**Forme active**

**B**

**Figure 38.** Mode d'activité proposé pour nos canaux ioniques artificiels

Bien que n'ayant pas mené d'études d'orientation dans des bicouches lipidiques, ils envisagent que très peu de peptide se retrouve, à un moment donné, dans la forme active ou « ouverte » (notée **B** sur la Figure 38), le restant étant soit adsorbé sur le lipide, soit sous forme agrégée. Le groupe de DeGrado présente ces diverses conformations comme étant en équilibre. Nous avons choisi la même option, en favorisant largement l'état agrégé. La forme **A** semble également très plausible: le peptide monomérique oriente sa partie très hydrophobe (les isopropyles des leucines) vers l'intérieur de la bicouche et ses éthers-couronne vers les têtes polaires des lipides, pour former des interactions électrostatiques très favorables. Cependant, **A** doit être vu comme représentatif de toute orientation aléatoire du peptide non agrégé dans la bicouche et peut ainsi être considéré comme la forme « fermée » du canal.

Ceci laisserait relativement peu de place à la forme active souhaitée **B**; celle-ci étant de plus défavorisée du fait de la non-orientation du peptide dans la bicouche, à cause de l'absence de têtes polaires.

Nous avons omis de possibles formes actives agrégées, pourtant suggérées par les mesures de conductivité monomoléculaires, tout simplement parce que leur orientation dans la bicouche ne semble pas plus vraisemblable que celle du monomère et qu'elle n'a pas été observée par ATR.

## CONCLUSION

Nous avons accompli la synthèse et la caractérisation de plusieurs variantes de canaux ioniques artificiels, suivant le modèle conçu au début de notre projet. Les études conformationnelles entreprises par la suite ont démontré que nos molécules adoptaient la structure désirée, à savoir, l'hélice  $\alpha$ . Nous avons alors entrepris diverses études d'activité qui ont permis de mettre en évidence le potentiel de canal ionique d'au moins deux de nos modèles, **29** et **30**. Cependant, la forte tendance à l'agrégation présentée par ces composés en milieu aqueux est un paramètre limitatif. De plus, ils se sont avérés incapables à s'orienter une fois introduits dans des bicouches lipidiques. Cette incapacité a été associée au fait que ces molécules ne portent pas de tête polaire. D'un autre côté, c'est cette même absence de groupement polaire qui semble leur conférer une activité, comparativement aux autres peptides.

Une solution pourrait être envisagée en utilisant divers autres substituants polaires, mais non chargés.

En raison de cette faible activité, nous n'avons pu mener à bien les études planifiées de sélectivité ionique selon la taille des couronnes. La porte reste ouverte si nous parvenons préalablement à obtenir un modèle très actif.

En effet, la versatilité de notre plan de synthèse permet d'envisager la production d'un très grand nombre de dérivés porteurs de plusieurs types de couronnes, en nombre variable.



Il reste néanmoins que notre modèle semble digne d'intérêt en vue d'utilisations à moyen terme en chimie des nanostructures. Une des applications futures de ces molécules sera la préparation d'un biosenseur pouvant s'insérer dans une monocouche auto-assemblée.

## **DEUXIÈME PARTIE**

### **PRÉPARATION DE PSEUDOROTAXANES PEPTIDIQUES PAR AUTO-ASSEMBLAGE**

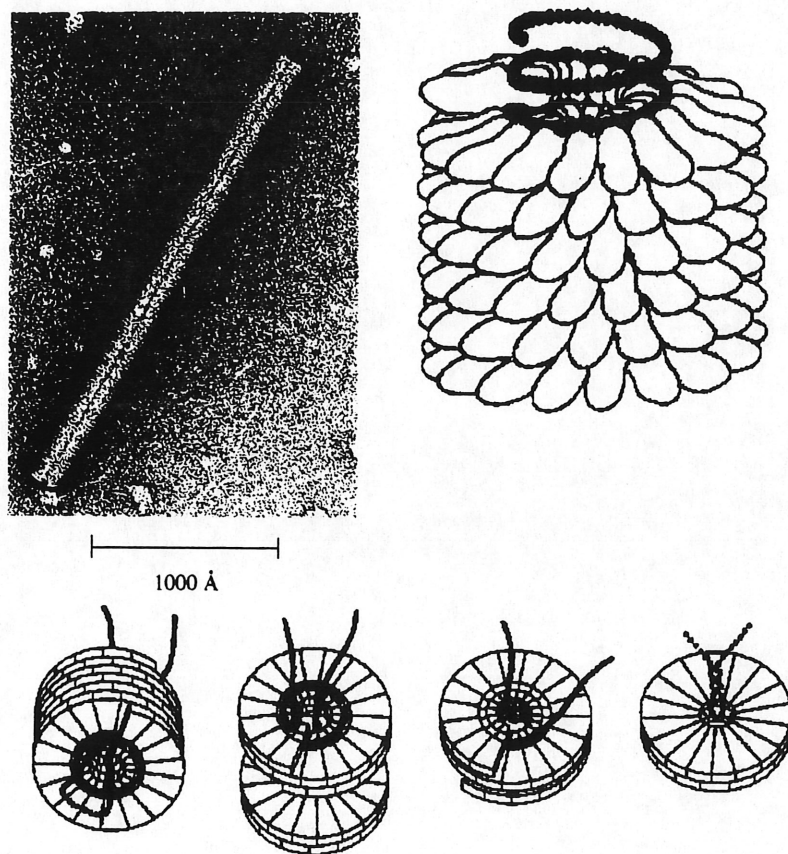
## INTRODUCTION

L'auto-assemblage (62) est l'essence même de la vie. La faculté que possèdent certaines molécules de s'organiser en superstructures exclusivement grâce à la formation de liens non-covalents, dits de faible énergie, a permis l'apparition des premiers organismes vivants.

Toutes les grandes familles de molécules biologiques sont pourvues de la faculté de s'auto-assembler (63). En premier lieu, nous considérerons les lipides qui peuvent s'organiser spontanément en bicouche, permettant par là-même la compartimentation, absolument essentielle à la plus petite sous-unité fonctionnelle de la vie: la cellule. Les polypeptides possèdent des facultés d'auto-assemblage beaucoup plus spécifiques, impliquées dans la constitution des structures quaternaires des protéines. Ce sont des interactions supramoléculaires très spécifiques entre polysaccharides qui sont à la base des phénomènes d'adhésion et de reconnaissance cellulaire. Enfin, le plus fascinant exemple nous est fourni par l'ADN, dont les deux brins complémentaires s'assemblent en double-hélice grâce à la formation d'une multitude de liens hydrogène.

L'auto-assemblage permet d'obtenir des structures très complexes à partir de composants relativement simples. Il permet de passer du domaine de la molécule, dont les composants atomiques sont liés par des liens covalents, à celui de la supramolécule maintenue par des liens non-covalents. Le premier d'entre eux étant le lien hydrogène, associé aux interactions hydrophobes,  $\pi$ - $\pi$  aromatiques, électrostatiques, pôle-dipôle, métal-ligand et de van der Waals. C'est l'addition de ces interactions stabilisantes, faibles individuellement

comparativement au lien covalent, qui permet de compenser le coût énergétique imposé par la diminution d'entropie du système. De plus, la création d'un lien de faible énergie étant un phénomène réversible, le processus peut s'auto-contrôler et s'auto-corriger pour conduire à des systèmes qui sont à l'équilibre thermodynamique.

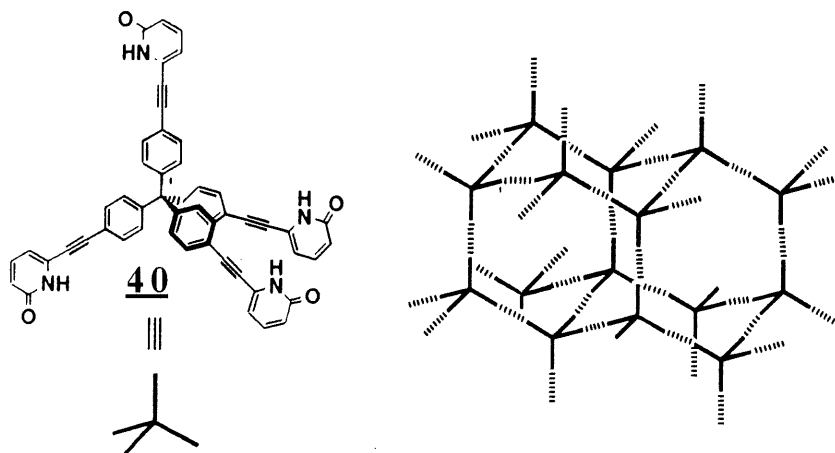


**Figure 39.** Le virus de la mosaïque du tabac et son processus d'auto-assemblage

On pourrait trouver de très nombreux exemples illustrant spectaculairement l'auto-assemblage supramoléculaire, mais celui du virus de

la mosaïque du tabac est particulièrement édifiant (64). Ce virus n'est constitué que de deux espèces chimiques: 2130 sous-unités protéiques de 158 acides aminés chacune, et un brin simple d'ARN de 6390 nucléotides. L'auto-assemblage de ces sous-unités conduit à la formation d'une particule virale longue de 300 nm et large de 18 nm (64b). Si l'on dispose ses constituants dans un milieu physiologique, le virus se reconstitue spontanément (Figure 39). Au niveau cellulaire, nous pouvons citer l'exemple des ribosomes. Nomura (65) a démontré que leurs sous-unités 30 S et 50 S pouvaient être assemblées *in vitro*, à partir de leurs constituants protéiques et ARN.

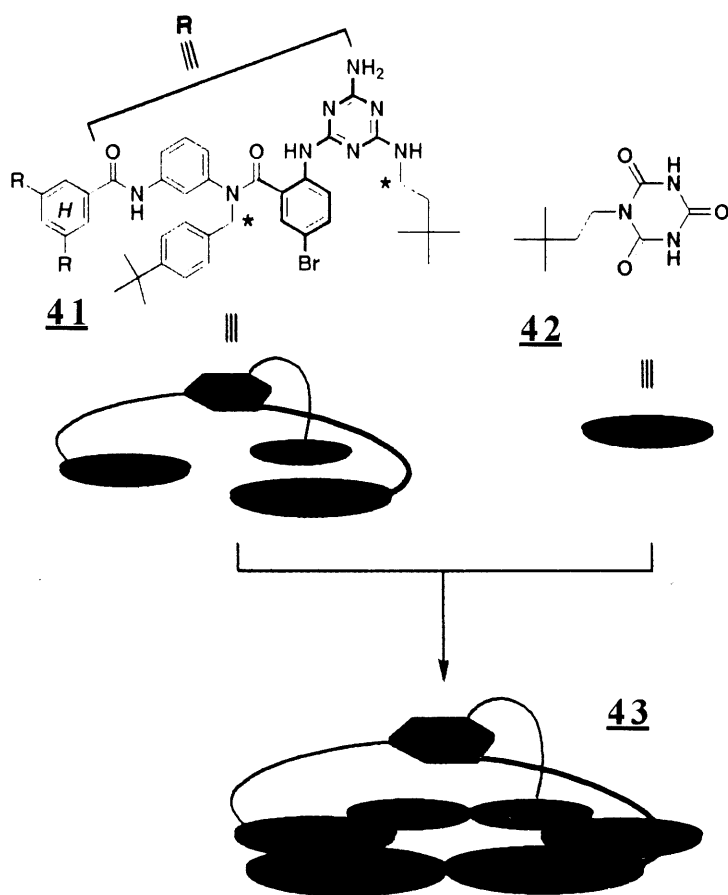
Le point commun à ces deux exemples est la production de structures complexes et de taille imposante à l'échelle moléculaire, par une synthèse supramoléculaire très convergente utilisant le minimum d'information génétique, nécessaire au codage de sous-unités relativement simples (62).



**Figure 40.** Les *tectons* de Wuest *et al.*

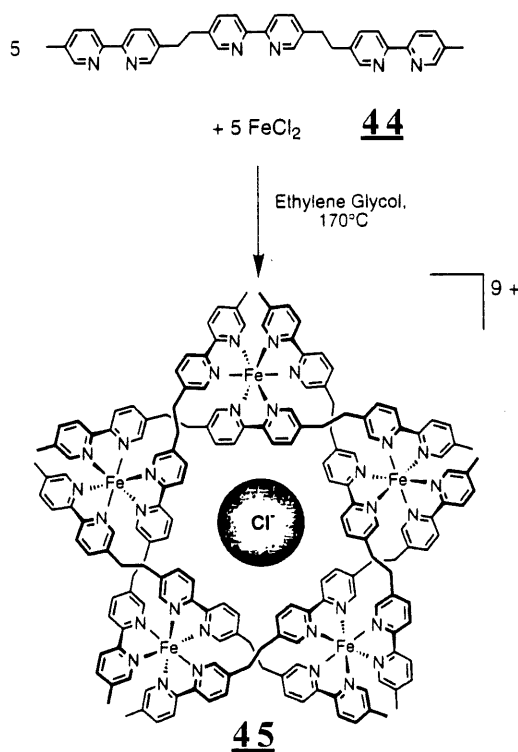
L'importance de la supramolécularité dans la Nature se devait d'attirer l'attention des chimistes. Ce fut le cas au tournant des années 1960 et un prix

Nobel devait récompenser en 1987 les pionniers que furent Pedersen, Lehn et Cram (66). De nos jours, la chimie supramoléculaire connaît un essor extraordinaire. Les chercheurs qui travaillent dans ce domaine se doivent de connaître, comprendre et maîtriser les lois qui régissent l'auto-assemblage. Leur but commun est de parvenir à produire des systèmes organisés fonctionnels, à l'échelle du nanomètre; c'est à dire à un niveau de complexité où la chimie covalente commence à se heurter à des barrières infranchissables ou, trop coûteuses en matière de temps et d'énergie.



**Figure 41.** Exemple de complexes basés sur des liens hydrogène obtenus par Whitesides *et al.*

La chimie supra-moléculaire suit actuellement deux courants principaux qui sont 1) *la synthèse supramoléculaire* 2) *l'assistance supramoléculaire à la synthèse moléculaire* (67). Ces deux courants s'appuient essentiellement sur l'auto-assemblage. Malgré le nombre de chimistes de renom travaillant dans le domaine, ou peut-être à cause de cela, il n'y a pas de définition très précise de ce qu'est l'auto-assemblage. On pourrait citer J. Fraser Stoddart disant qu'il s'agit de « l'assemblage spontané d'architectures supra-moléculaires bien définies à partir de briques moléculaires très spécifiques ».



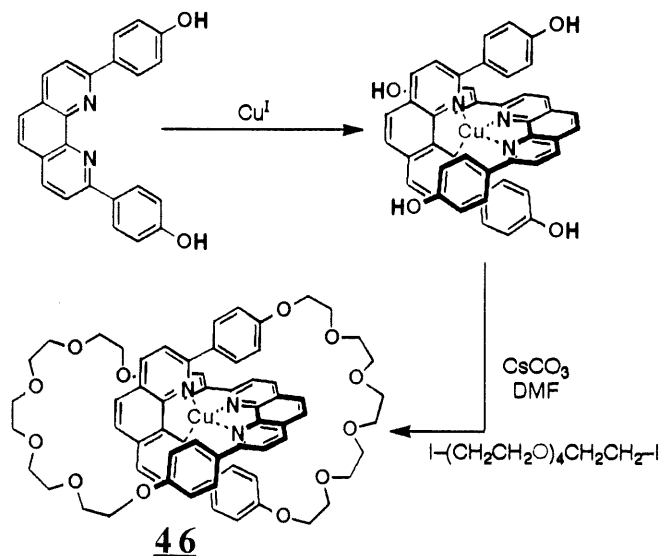
**Figure 42.** Double hélicate circulaire de Lehn *et al.*

Dans le domaine de *la synthèse supramoléculaire*, nous donnerons comme exemple les travaux de Wuest *et al.* (68) sur les *tectons*. Le composé **40**

comportant un coeur tétraarylméthane rigide et portant des unités pyridone à ses extrémités, cocrystallise avec de l'acide butyrique en un réseau diamantoïde, grâce à la formation de multiples liens hydrogène (Figure 40).

Whitesides *et al.* (69) se sont également appuyés sur la formation de nombreux liens hydrogène entre la mélamine et l'acide cyanurique pour construire des structures d'échelle nanométrique, en solution ou à l'état cristallin. Les composés **41** et **42** produisent des complexes 3:1 **43** très stables (Figure 41). Par RMN, on note l'apparition de deux signaux différents pour les protons des méthylènes (marqués \*) devenus diastéréotopiques.

Rebek (70) a décrit la dimérisation par auto-assemblage de deux calix[4]arènes, sous forme de capsule pouvant piéger des espèces comme le fluorobenzène ou le cubane.

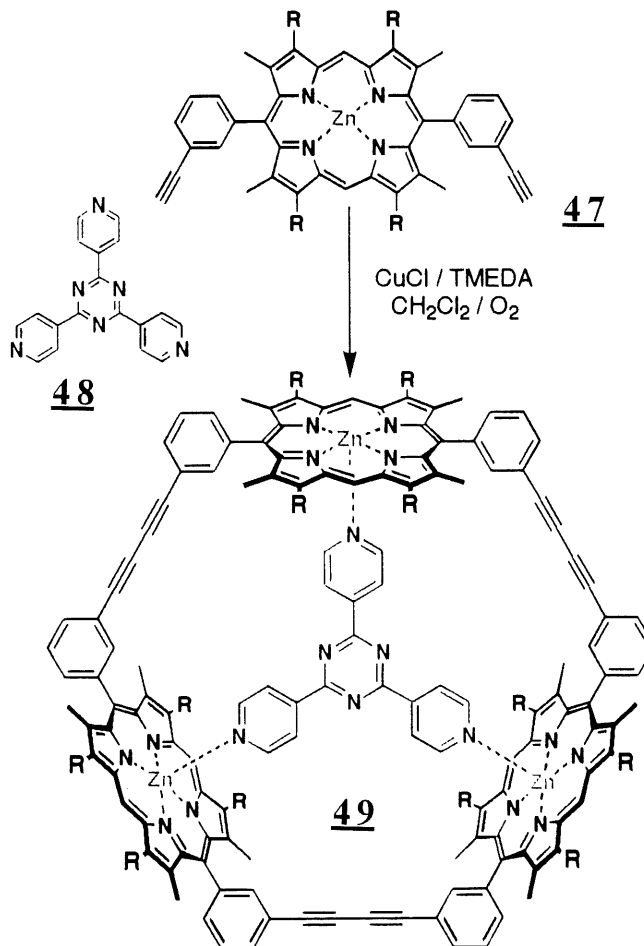


**Figure 43.** Un [2]caténate à base de cuivre(I) préparé par Sauvage *et al.*

Les interactions métal-ligand ont également permis la production d'exemples fascinants, comme le double hélicate circulaire de Lehn *et al.* (71).



En chauffant à 170 °C un mélange de **44** et de 1 équivalent de chlorure de fer(II), on peut précipiter le double hélicate **45** par addition d'hexafluorophosphate d'ammonium (Figure 42). Enfin, les nanotubes de Ghadiri (18) sont également à ranger dans ce domaine (*cf.* première partie).



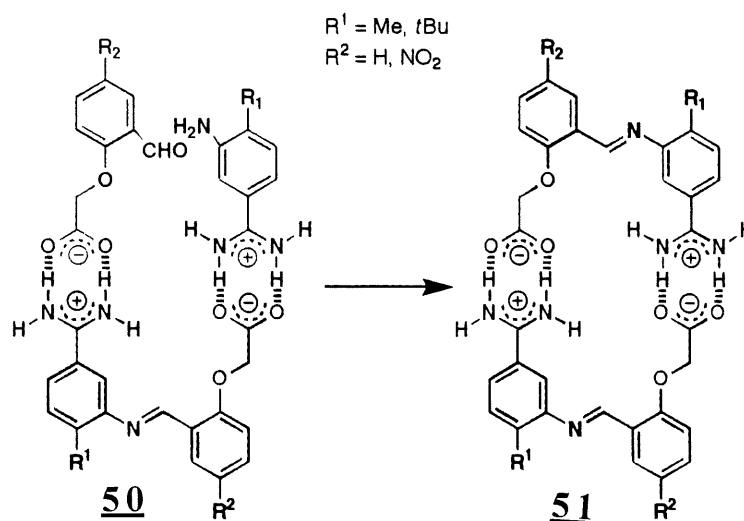
**Figure 44.** Récepteur macrocyclique pouvant servir de catalyseur à certaines réactions de Diels-Alder proposé par Sanders *et al.*

*L'assistance supramoléculaire à la synthèse moléculaire* exploite également l'auto-assemblage, préalablement à la création d'un lien covalent.

Elle est déjà utilisée en synthèse organique classique, comme dans le cas des réactions d'époxydation. Il est connu que ces réactions sont orientées en *cis* par rapport à un groupement hydroxyle présent sur la molécule époxydée. La formation d'un lien hydrogène serait à la base de cette stéréosélectivité. Nous pouvons également citer le cas de l'*effet «template»* (38).

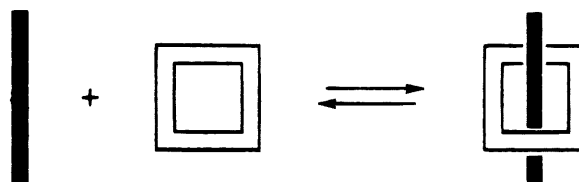
En règle générale, l'assistance supramoléculaire permet l'obtention de structures dont la synthèse parait, à première vue, improbable ou extraordinairement complexe. Sauvage *et al.* (72) se servent des interactions ligand-métal pour synthétiser de façon efficace des *caténates*, tel que **46**, à partir de phénanthrolines disubstituées et de cuivre(I) (Figure 43).

Le groupe de Sanders (73) utilise ces mêmes interactions pour produire ses récepteurs triporphyriniques. Le composé **49** peut être préparé par trimérisation oxydative de **47**, mais le rendement augmente de façon spectaculaire en présence de **48** (Figure 44). Le récepteur macrocyclique peut servir par la suite de catalyseur dans des réactions de cyclo-addition impliquant des diènes et diénophiles azotés.



**Figure 45.** Un système auto-répliatif conçu par Tertfort et von Kiedrowski

Un domaine de recherche actuellement en plein essor est celui des systèmes *auto-réplicatifs*. A ce sujet, nous pouvons donner l'exemple des travaux de Tertfort et von Kiedrowski (74). En utilisant les interactions électrostatiques entre des amidiniums et des carboxylates, ils catalysent la formation d'un lien imine en contraignant les deux groupements réactifs à se rapprocher dans l'espace. Ces systèmes se heurtent parfois à des problèmes d'inhibition par le produit. Dans cet exemple, le système ternaire **50** s'avère plus favorisé que le binaire **51** et l'auto-réplication s'autocatalyse de façon exponentielle (Figure 45). Nous pouvons également rapporter le modèle de peptide auto-réplicatif de Ghadiri (75), qui exploite à profit des phénomènes d'agrégation peptidique.

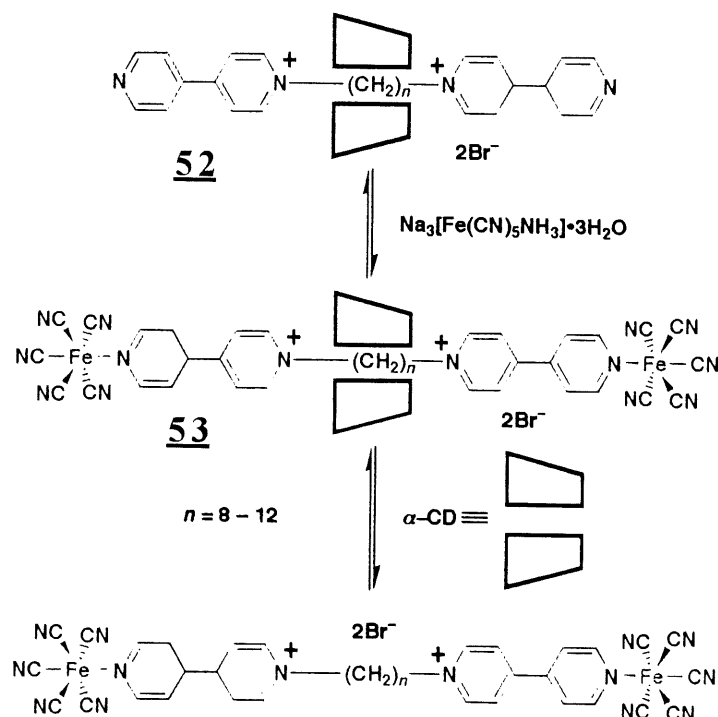


**Figure 46.** Schéma de formation d'un [2]pseudorotaxane

Depuis environ 5 ans, les réalisations du groupe de Stoddart sont au centre des avancées de la chimie supramoléculaire. Ses travaux sont reliés aux deux domaines décrits ci-dessus et, pour simplifier, nous les répartirons en deux groupes. 1) Celui des *pseudorotaxanes* appartenant au domaine de la synthèse supramoléculaire. 2) Celui des *rotaxanes* et *caténanes* se rapportant à celui de l'assistance supramoléculaire à la synthèse moléculaire.

Un [n]pseudorotaxane est une superstructure de n composés maintenus associés par des liaisons non-covalentes, dans laquelle au moins un composé en

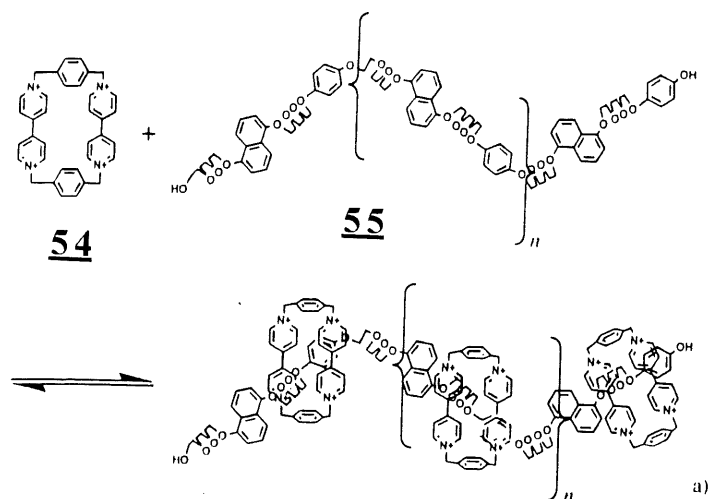
encercle un autre dans un processus réversible. La Figure 46 schématise la formation d'un [2]pseudorotaxane.



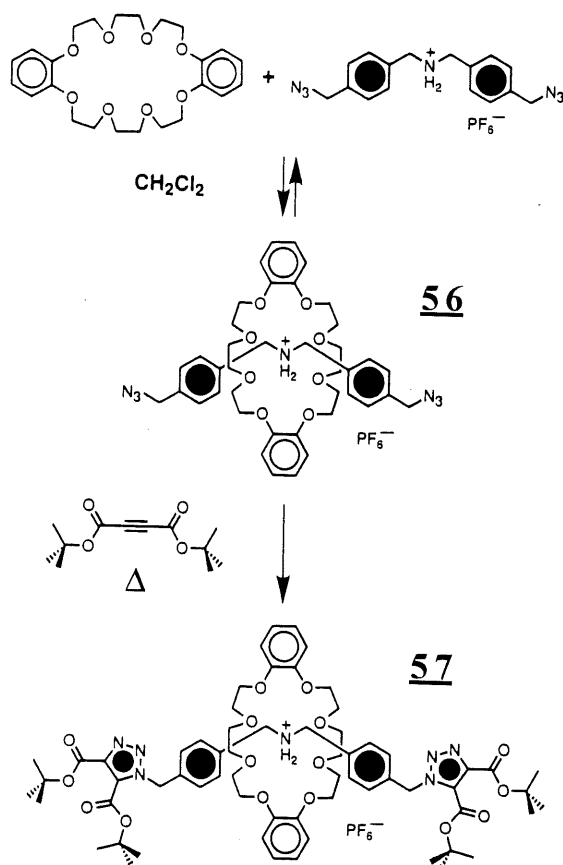
**Figure 47.** Pseudorotaxane impliquant une cyclodextrine préparé par Wylie et Macartney

Dans un passé récent, les premiers exemples décrits impliquaient des interactions hydrophobes et de van der Waals, par le biais de cyclodextrines. C'est le cas d'une des réalisations de Wylie et Macartney (76) où le complexe  $\alpha$ -cyclodextrine-bispyridylpyridinium **52** forme le pseudorotaxane **53** en présence de pentacyanoferrate(II) (Figure 47).

Le groupe de Lehn (77) a donné des exemples d'utilisation d'interactions métal-ligand lors de la formation d'un [4]pseudorotaxane contenant du cuivre et des oligobipyridines.



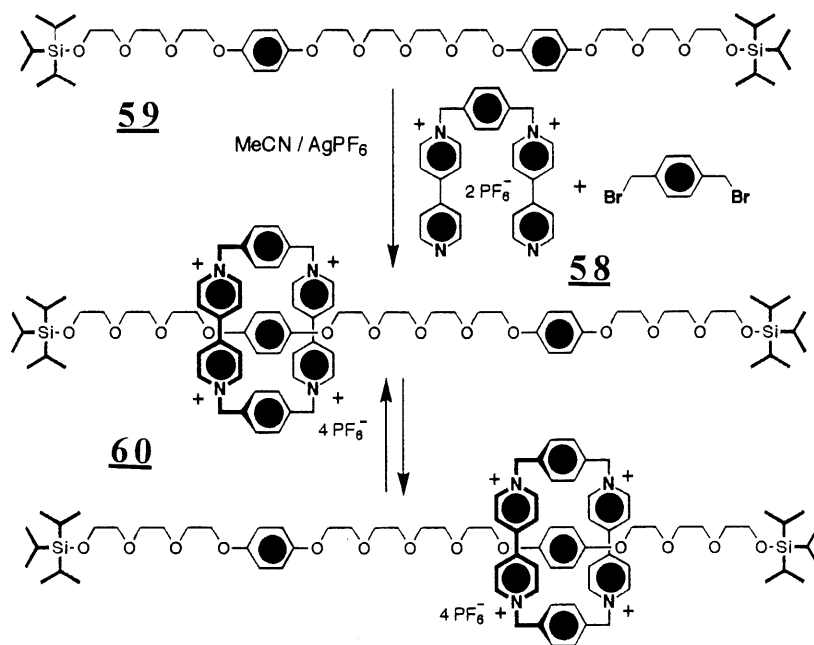
**Figure 48.** Polypseudorotaxane basé sur des interactions  $\pi$ - $\pi$  aromatiques décrit par Parsons *et al.*



**Figure 49.** [2]rotaxane préparé par Stoddart *et al.* par blocage d'un pseudorotaxane préformé

Parsons (78) utilise des interactions  $\pi$ - $\pi$  aromatiques avec transfert de charge entre les macrocycles 54, contenant des bipyridiniums, et des aromatiques riches en électrons fixés sur le long bras polyétheré 55, pour fabriquer des polypseudorotaxanes (Figure 48).

Stoddart *et al.* (79) ont quant à eux également produit des pseudorotaxanes mettant en jeu ces mêmes liaisons. Mais la majeure partie de leurs travaux dans le domaine implique la complexation d'ammoniums secondaires polybenzyliques par des éthers-couronne (80). Ceci, étant à la base de nos travaux, sera plus amplement développé dans le chapitre 1.



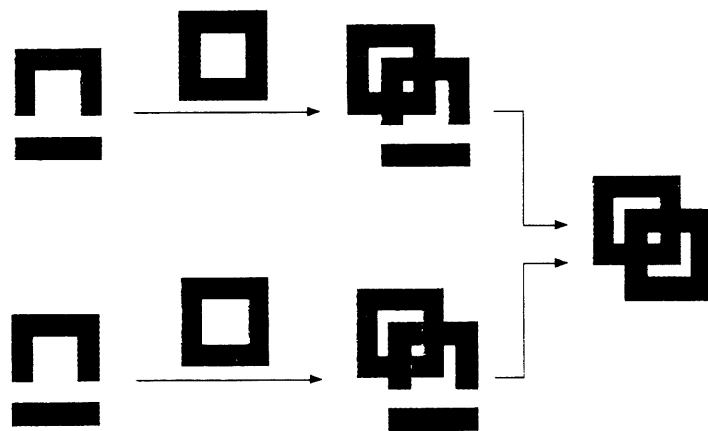
**Figure 50.** [2]rotaxane préparé par Stoddart *et al.* par macrocyclisation autour d'un bras polyétheré

Les [n]rotaxanes peuvent être définis comme des pseudorotaxanes mécaniquement bloqués sous leur forme complexée. Ils sont produits selon une des trois méthodes suivantes:

1) Par introduction d'un groupement volumineux aux deux extrémités du bras, après que la complexation ait eu lieu. Stoddart *et al.* (81) ont fourni l'exemple du composé **57** qui provient d'une réaction d'addition dipolaire-1,3 sur le [2]pseudorotaxane **56** (Figure 49). Nous pouvons également noter les polyrotaxanes rapportés par Born et Ritter, formés à partir de cyclodextrines et de polyméthacrylate (82).

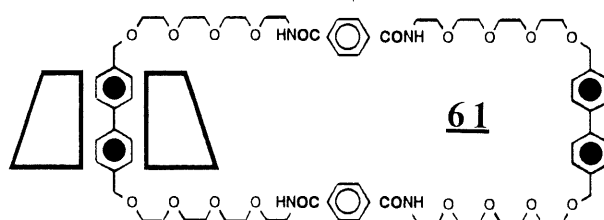
2) Par macrocyclisation d'un composé autour d'un bras servant de support. C'est également le groupe de Stoddart (83) qui obtient le [2]rotaxane **60** par cyclisation du bispyridylpyridinium **58** sur un bras polyétheré **59**, dont les deux extrémités sont constituées d'encombrants groupements triisopropylsilyles (Figure 50).

3) Par pénétration, après chauffage, d'un bras encombré dans le macrocycle (84).



**Figure 51.** Schéma de formation d'un [2]caténane

Enfin, les [n]caténanes sont constitués de n macrocycles connectés mécaniquement entre eux, mais pas par des liens covalents. Un schéma d'une réaction de caténation est donné par la Figure 51.



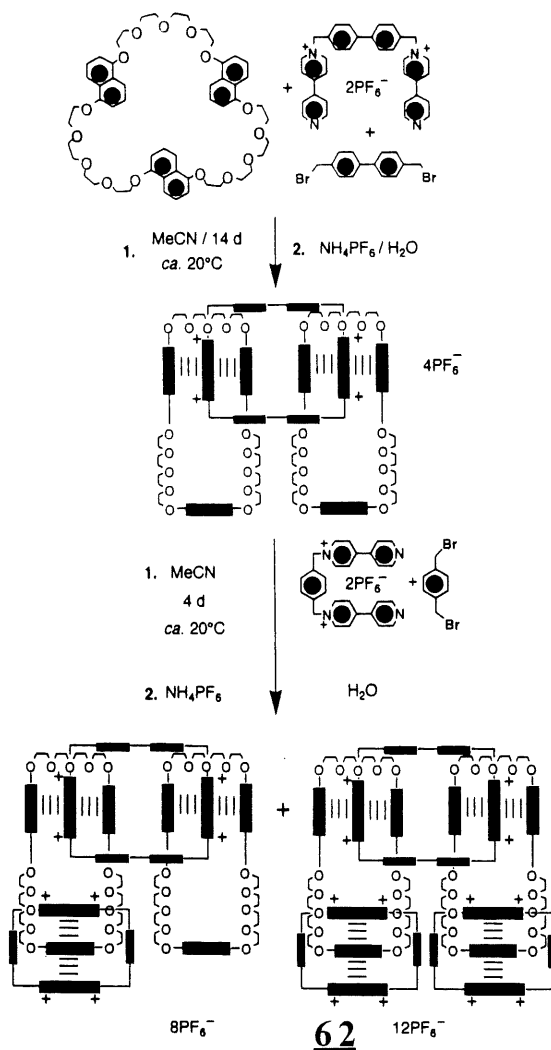
**Figure 52.** [2]caténane impliquant une cyclodextrine synthétisé par Stoddart, *et al.*

Ici encore, les plus belles réalisations sont l'oeuvre du groupe de Stoddart. Elles peuvent impliquer des cyclodextrines et un macrocycle biphénylé (61, Figure 52), par interactions hydrophobes ou de van der Waals (85). Mais plus fréquemment, des phénomènes de transfert de charges sont mis en jeu pour conduire à des [4] et [5]caténanes (Figure 53), dont l'exemple le plus abouti est l'*olympiadane* 62 (86).

Il est intéressant de noter dans les exemples cités ci-dessus, l'exploitation de forces largement répandues dans le monde vivant pour produire des systèmes totalement artificiels. Les matériaux impliqués sont eux-mêmes synthétiques, à l'exception des peu sélectives cyclodextrines. Ce n'est que très récemment que Ghadiri a décrit son modèle de peptide auto-répliatif et que Leigh (87) a fait une timide tentative d'exploitation de peptides achiraux pour



la synthèse de [2]rotaxanes. Il semblerait pourtant très avantageux d'utiliser des matériaux d'essence biologique dans une chimie d'auto-assemblage guidée par l'homme. On connaît les avantages que ceux-ci présentent en terme de chiralité, sélectivité, organisation structurale, abondance naturelle, biodégradabilité, *etc...*, surtout si l'on envisage une application pratique, à moyen terme, à tous ces élégants systèmes brillamment élaborés.



**Figure 53.** [4] et [5]caténanes (*olympiadane*) obtenus par Stoddart *et al.*

C'est le défi que nous nous sommes donnés dans cette partie de notre travail: réussir à impliquer un composé d'essence biologique, bien que synthétique, dans la préparation d'une superstructure produite par un strict processus d'auto-assemblage. Et si notre choix s'est porté sur les pseudorotaxanes, c'est non seulement car ils constituent une première cible accessible dans la chimie supramoléculaire. Mais peut-être aussi parce que le virus de la mosaïque du tabac peut être considéré comme le plus achevé des pseudorotaxanes.

## CHAPITRE 1

### CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES CONSTITUANTS

#### 1.1 Préambule

Notre projet consiste à préparer des [2]pseudorotaxanes de nature peptidique. Sa conception s'appuiera sur les travaux du groupe de Stoddart (80,88) concernant la préparation de [n]pseudorotaxanes à partir de polyammoniums secondaires polybenzyliques et d'éthers-couronne contenant des cycles aromatiques. En effet, la préparation de ces composés présente l'avantage d'être simple, les deux constituants étant commercialement disponibles ou de synthèse aisée, et de mener à des structures supramoléculaires parfaitement caractérisées par diffraction des rayons X (état solide), RMN  $^1\text{H}$  (état liquide) et spectrométrie de masse (état gazeux). Nous apporterons au projet notre expérience dans la conception et la préparation de peptides modifiés par des éthers-couronne, qui sont au centre des réalisations de notre laboratoire depuis près de dix ans (36,89).

#### 1.2 Conception des peptides modifiés (*hôtes*)

Les justifications à l'implication de peptides dans la préparation de [2]pseudorotaxanes sont en partie exposées dans les introductions générale et

de la deuxième partie. Nous pouvons cependant développer les avantages présentés par un tel choix.

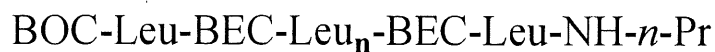
Les polypeptides sont des polymères chiraux. Il y a relativement peu d'exemples d'assemblages supramoléculaires qui possèdent de la chiralité, bien que l'on puisse citer les « pretzels » moléculaires de Vögtle (90) et certains caténanes de Stoddart *et al.* (91), tous préparés en mélange racémique. Il y en a encore moins qui impliquent des constituants eux-mêmes chiraux (92). Dans notre cas, nous pouvons facilement présenter, dans les deux niveaux, chiralité et énantiospécificité.

Les polypeptides adoptent, sous certaines conditions, des conformations bien définies. Ceci permet d'envisager d'orienter les groupements fonctionnels de façon précise dans l'espace. De plus, la possibilité d'insérer dans le peptide un grand nombre de sites-*hôtes* peut nous laisser envisager de bénéficier d'un effet de coopérativité et la formation de complexes stables.

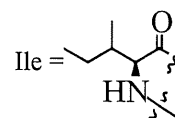
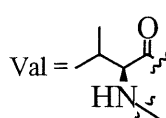
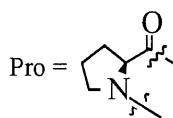
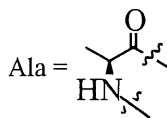
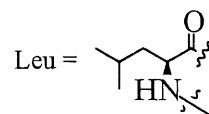
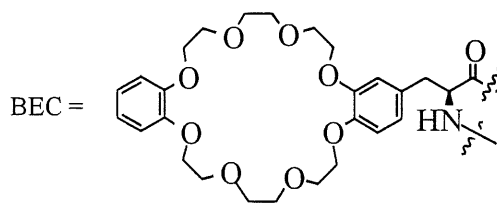
Enfin, les peptides sont des polymères stables mais biodégradables, relativement facile à synthétiser et offrant des possibilités infinies de combinaisons différentes.

Les premiers modèles dont nous avons envisagé la synthèse sont des polyleucines portant des éthers-couronne, homologues de ceux décrits dans la première partie. Le choix s'est porté sur la L-leucine en raison de sa forte propension à induire une structure secondaire organisée, à savoir une hélice  $\alpha$  (34). De cette manière nous profiterions pleinement des avantages conférés par les peptides, en fixant de façon précise la localisation de nos éthers-couronne dans l'espace, dans le peptide libre.

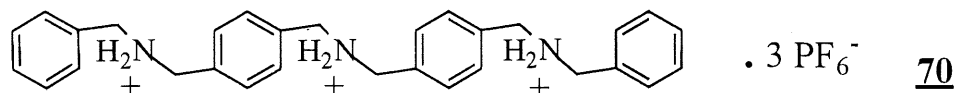
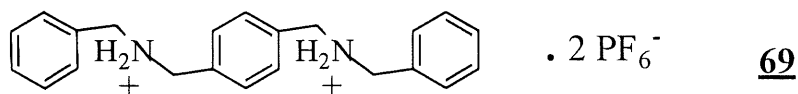
## HÔTES



avec:



## INVITÉS



**Figure 54.** Hôtes et invités conçus pour la préparation des pseudorotaxanes peptidiques

De plus, nos expériences précédentes nous laissaient espérer une bonne solubilité de ces composés dans les solvants organiques. Après construction de modèles CPK, nous avons décidé de jouer modérément sur deux paramètres facilement modulables: 1) la distance entre les éthers-couronne 2) leur nombre sur le polypeptide. Ceci nous a amené à concevoir la synthèse des 4 polyleucines modifiés **63-66** (Figure 54).

Il y avait tout de même quelques objections à faire quant à ces choix. Le fait d'« imposer » une conformation préférentielle aux peptides ne risquait-il pas de biaiser les résultats, voire de nous faire manquer notre objectif ? De plus, ces polypeptides répétitifs s'avéraient assez prohibitifs à une étude poussée par RMN.

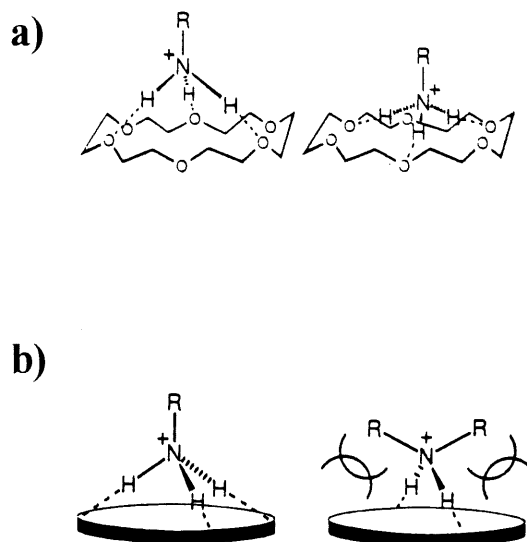
Ceci nous a amené à envisager deux autres prototypes, **67** et **68**, constitués d'acides aminés différents, monofonctionnels et non-aromatiques. Le peptide **68** comporte une contrainte conformationnelle supérieure du fait de la présence d'une L-proline en son coeur.

Restait enfin le choix de l'éther-couronne. Celui-ci a été dicté par le choix même de notre *invité* (cf. 1.3). Il s'agit du dibenzo-24-couronne-8 (DB24C8), dont nous envisageons une synthèse similaire à celle du 21-couronne-7 décrit dans la première partie.

### **1.3 Conception des polyammoniums secondaires polybenzyliques (*invités*)**

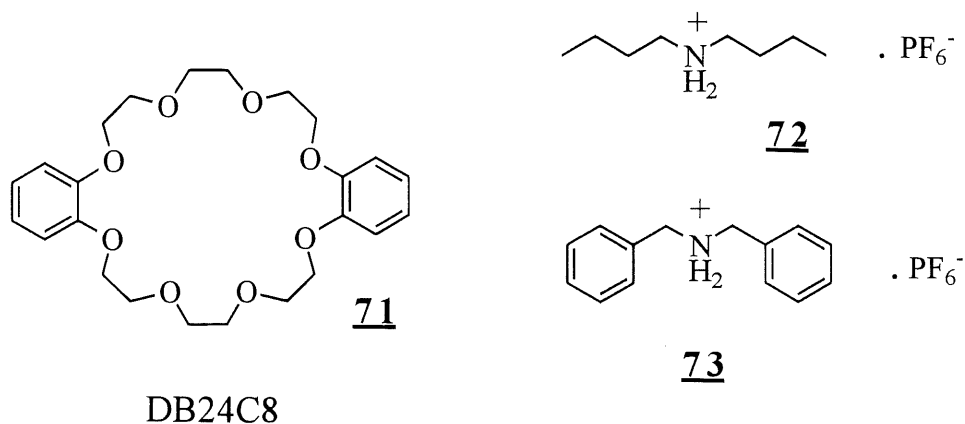
L'implication de polyammoniums secondaires dans la préparation de pseudorotaxanes a été rapportée pour la première fois en 1995 par Stoddart *et al.* (88a). Si le pouvoir complexant des éthers-couronne sur les ammoniums

primaires est connu depuis les travaux de Pedersen (93), peu d'études ont fait cas des ammoniums secondaires (94). La raison principale est que le très étudié 18-couronne-6 complexe préférentiellement les ammoniums selon le mode *perché*, essentiellement grâce à des liaisons hydrogène  $[-N^+-H...O]$  (95).



**Figure 55.** Schéma de complexation d'un ammonium par un 18-couronne-6  
a) mode *perché* et mode *niché* b) ammonium aliphatique primaire et secondaire

Or, ce mode de complexation est très défavorisé dans le cas des ammoniums secondaires, pour des raisons stériques (Figure 55). La complexation de ces derniers ne peut se faire correctement que si l'ammonium pénètre totalement dans la couronne et donc, impose que celle-ci soit constituée par un macrocycle d'au moins 24 atomes (96). Les études impliquant les composés appropriés n'ayant pas été menées 30 ans après la découverte des éthers-couronne, il restait à en faire l'essai.

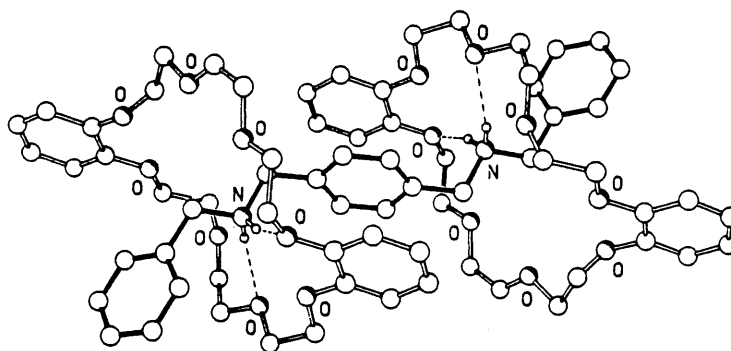
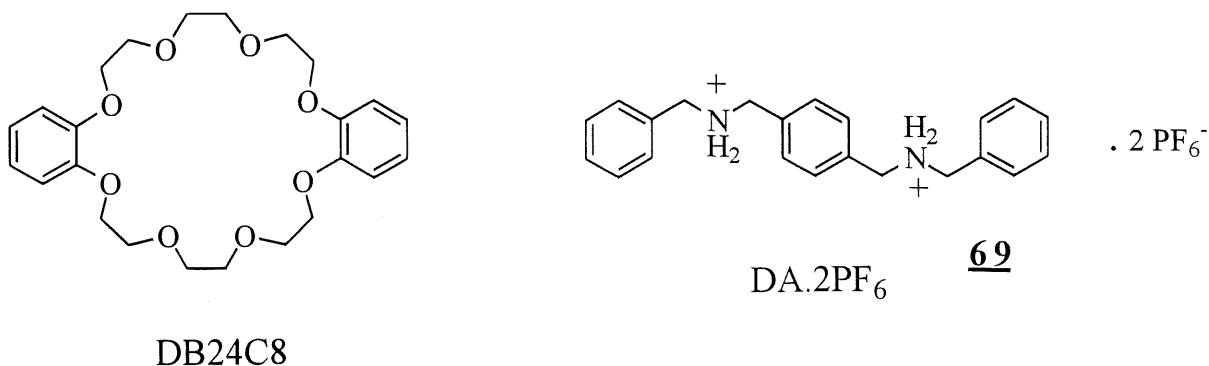


**Figure 56.** Éléments utilisés par Stoddart *et al.* pour la préparation d'un [2]pseudorotaxane à partir de sels d'ammoniums secondaires

Le groupe de Stoddart a donc préparé des complexes entre DB24C8 **71** et deux sels d'ammoniums secondaires: un aliphatique **72**, l'autre aromatique **73** (Figure 56). Dans les deux cas, des [2]pseudorotaxanes cristallisables ont été obtenus, pour autant que le contre ion soit l'anion très mou hexafluorophosphate. Des différences majeures entre les deux complexes apparaissaient par RMN <sup>1</sup>H. Alors que dans le premier, l'ammonium aliphatique ne donnait qu'un type de signal, fait révélateur de vitesses de complexation et de décomplexation rapides à l'échelle de temps de la RMN; son homologue aromatique présentait deux types de signaux pour les protons des méthylènes benzyliques, suivant qu'ils appartenaient à des espèces complexées ou pas (80). De plus, les valeurs des constantes d'association (K<sub>a</sub>) favorisaient le complexe « aromatique » par un facteur 10 dans l'acétonitrile. Les différences cinétiques s'expliquent par les contraintes stériques supérieures imposées par le passage des phényles au travers de la couronne.



Les différences de stabilité ont été interprétées après analyse des structures cristallines de ces composés et d'autres préparés ultérieurement.



**Figure 57.** Structure cristalline du [3]pseudorotaxane obtenu par Stoddart *et al.* avec DB24C8 et le diammonium DA·2PF<sub>6</sub> **69**

Le groupe de Stoddart (80,88c,97) a produit une grande quantité d'autres [n]pseudorotaxanes impliquant le même type de sous-unités, comme celui formé par DA·2PF<sub>6</sub> **69** et 2 équivalents de DB24C8 **71** (Figure 57).

La structure cristalline révèle un ensemble de liaisons de faible énergie impliquées dans la stabilisation du complexe. A savoir, 1) des liens hydrogène

$[-N^+-H...O]$  2) des liens hydrogène  $[-C-H...O]$  3) un empilement  $\pi$ - $\pi$  aromatique triple 4) des interactions pôle-dipôle  $[-N^+...O]$ .

L'ensemble de ces données, associé à la facilité de faire changer la stoechiométrie des complexes par une simple modification de taille des constituants (longueur pour les ammoniums ou diamètre pour les éthers-couronne), nous a amené à choisir les polyammoniums polybenzyliques **69** et **70** (Figure 56) comme *invités* dans la préparation de nos pseudorotaxanes peptidiques.

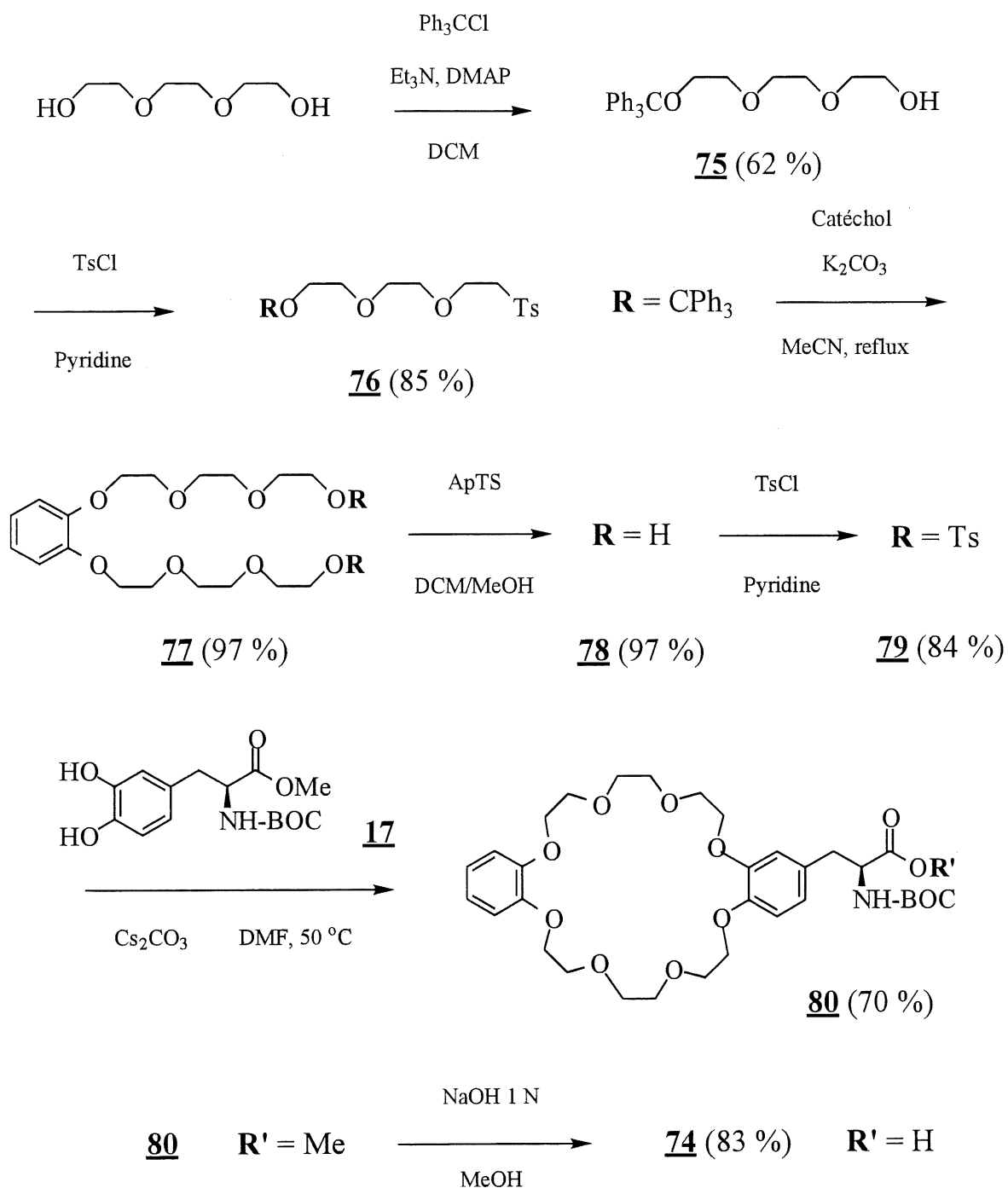
## 1.4 Synthèse des peptides modifiés

### 1.4.1 Synthèse de la N-BOC-3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanine

#### BOC-BEC-OH **74**

La stratégie de synthèse de cet acide aminé, porteur d'un éther-couronne, aura pour étape-clé une réaction de macrocyclisation, en conditions haute dilution, entre la BOC-L-DOPA-OMe **17** et un arylpolyéthylène glycol activé **79**. Ceci constitue la partie commune avec la préparation de BOC-ECV-OH décrite dans la première partie. La différence se fait en amont: étant donné que le polyéthylène glycol désiré n'est pas commercial, nous avons dû le préparer.

La première étape (Figure 58) consiste à effectuer la monoprotection du triéthylène glycol. Par la force des choses, il s'agit d'une réaction « statistique ».



**Figure 58.** Schéma de synthèse de BOC-BEC-OH **74**

Nous favorisons la production du produit monoprotégé en travaillant avec 1 équivalent de chlorure de trityle pour 4 fonctions alcool. Le choix de ce groupement protecteur a été dicté par la nécessité de préparer de grandes quantités de produit. En effet, il s'avère dans ce cas très facile de se débarrasser du composé diprotégé, qui est cristallisable. Le groupement trityle confère une faible solubilité dans l'eau à 75, ce qui permet également d'éliminer aisément le glycol non réagi. Après tosylation de la fonction alcool restante dans les conditions classiques, nous faisons réagir du catéchol sur deux polyéthylène glycols 76. Cette réaction, quoiqu'assez longue, est quantitative au vu de la RMN du brut. Après déprotection des fonctions alcool de 77, nous obtenons le polyéthylèneglycol désiré 78. Celui-ci sera activé sous forme du ditosylate 79, plutôt que du dibromure utilisé dans la première partie. Le groupement tosyle est non seulement un meilleur nucléofuge, mais il permet aussi d'éviter les problèmes présentés par les contaminations dues à la triphénylphosphine et à son oxyde. Nous passons alors à la réaction de macrocyclisation sur la BOC-L-DOPA-OMe 17, dans le DMF, en présence de carbonate de césium. Nous obtenons de très bons rendements, allant jusqu'à 90 %. Ceci est expliqué par l'« effet-template » (38): après substitution sur un premier oxygène du phénol, le contre-ion césium facilite la réaction intramoléculaire par interactions pôle-dipôle avec le polyéthylène glycol. Il est intéressant de noter que dans le cours d'un projet portant sur la *synthèse supramoléculaire*, nous bénéficions d'une *assistance supramoléculaire* à la *synthèse moléculaire*. Il ne reste qu'à saponifier l'ester 80 pour obtenir l'acide aminé désiré 74. Nous noterons que le rendement moyen s'entend sur le produit précipité, opération qui s'avère assez ardue. Le rendement global de la synthèse de BOC-BEC-OH 74 est de 24 %.

### 1.4.2 Synthèse peptidique

Nous utilisons la synthèse en phase solide, avec de la résine de Kaiser (résine oxime) **20** et des acides aminés protégés par le groupement *t*-butyloxycarbonyle (BOC). Cette stratégie est décrite dans la première partie en 1.3.2.2.

L'étape de clivage du peptide fixé sur le support solide est ici effectuée par de la *n*-propylamine (10 % dans le DCM). Ce clivage conduit aisément aux amides *n*-propyliques des peptides désirés, de formule générale: BOC-Peptide-NH-*n*-Pr. Ces composés sont ensuite purifiés par HPLC puis, lyophilisés pour permettre l'obtention de solides floconneux. Nous envoyons un échantillon en spectrométrie de masse (ES) et les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 4.

**Tableau 4.** Peptides-hôtes synthétisés

Peptide	Nom	Formule	Masse calculée	Masse trouvée
<b>63</b>	BOC-Leu-BEC-Leu <sub>3</sub> -BEC-Leu-NH- <i>n</i> -Pr	C <sub>92</sub> H <sub>142</sub> N <sub>8</sub> O <sub>25</sub>	1759	1759
<b>64</b>	BOC-Leu-BEC-Leu <sub>4</sub> -BEC-Leu-NH- <i>n</i> -Pr	C <sub>98</sub> H <sub>153</sub> N <sub>9</sub> O <sub>26</sub>	1873	1873
<b>65</b>	BOC-Leu-BEC-Leu <sub>3</sub> -BEC -Leu <sub>3</sub> -BEC-Leu-NH- <i>n</i> -Pr	C <sub>137</sub> H <sub>210</sub> N <sub>12</sub> O <sub>37</sub>	2617	2617

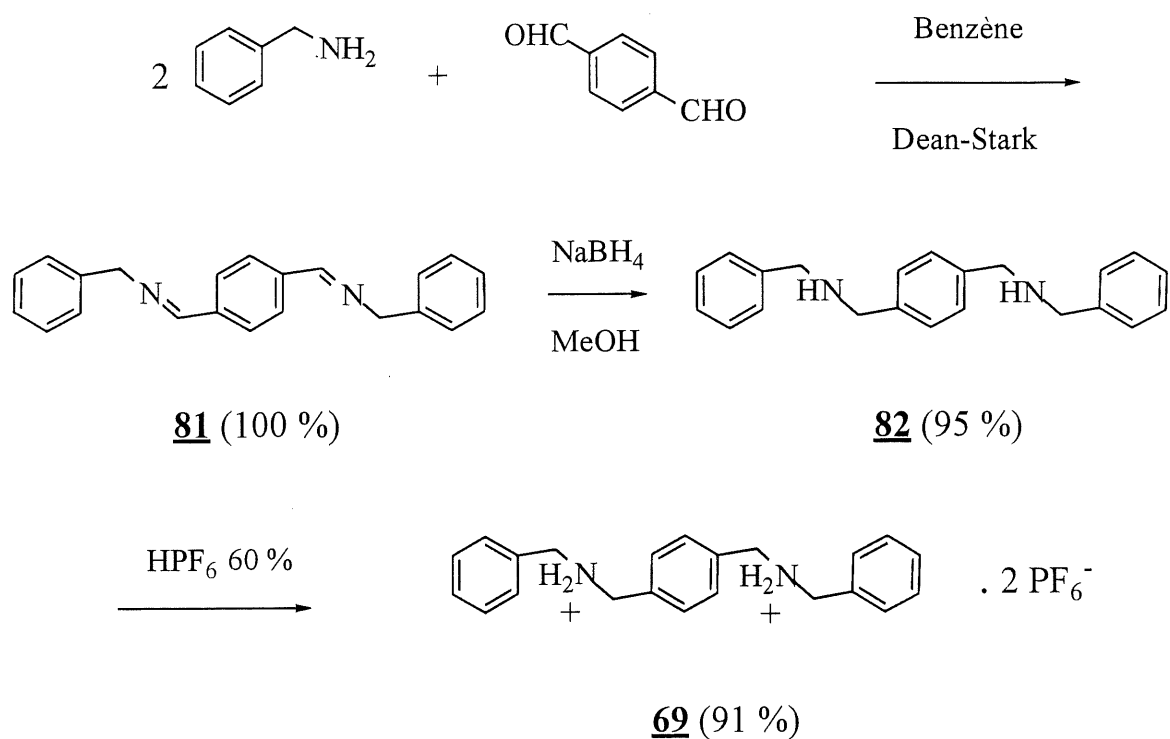
Peptide	Nom	Formule	Masse calculée	Masse trouvée
<u>66</u>	BOC-Leu-BEC-Leu <sub>4</sub> -BEC -Leu <sub>4</sub> -BEC-Leu-NH- <i>n</i> -Pr	C <sub>149</sub> H <sub>232</sub> N <sub>14</sub> O <sub>39</sub>	2843	2843
<u>67</u>	BOC-Leu-BEC-Ile-Val -Ala-BEC-Leu-NH- <i>n</i> -Pr	C <sub>88</sub> H <sub>134</sub> N <sub>8</sub> O <sub>25</sub>	1704	1704
<u>68</u>	BOC-Leu-BEC-Ile-Pro -Ala-BEC-Leu-NH- <i>n</i> -Pr	C <sub>88</sub> H <sub>132</sub> N <sub>8</sub> O <sub>25</sub>	1702	1702

## 1.5 Synthèse des sels de polyammoniums secondaires polybenzyliques

### 1.5.1 Synthèse de DA•2PF<sub>6</sub> 69

La synthèse utilisée est décrite par Stoddart *et al.* (80). Elle consiste à préparer la diimine 81 à partir de benzylamine et de téréphtalaldéhyde, dans un montage de Dean-Stark (Figure 59). Le composé obtenu est directement réduit par le borohydrure de sodium pour obtenir la diamine désirée 82, avec un rendement de 95 % pour les deux étapes. Nous préparons le sel di-hexafluorophosphate correspondant en utilisant de l'acide hexafluorophosphorique, bien qu'il ne s'agisse pas de la méthode décrite par le groupe de Stoddart. La poudre blanche obtenue est abondamment lavée à l'eau froide pour éliminer l'excès d'acide, puis séchée exhaustivement. Les

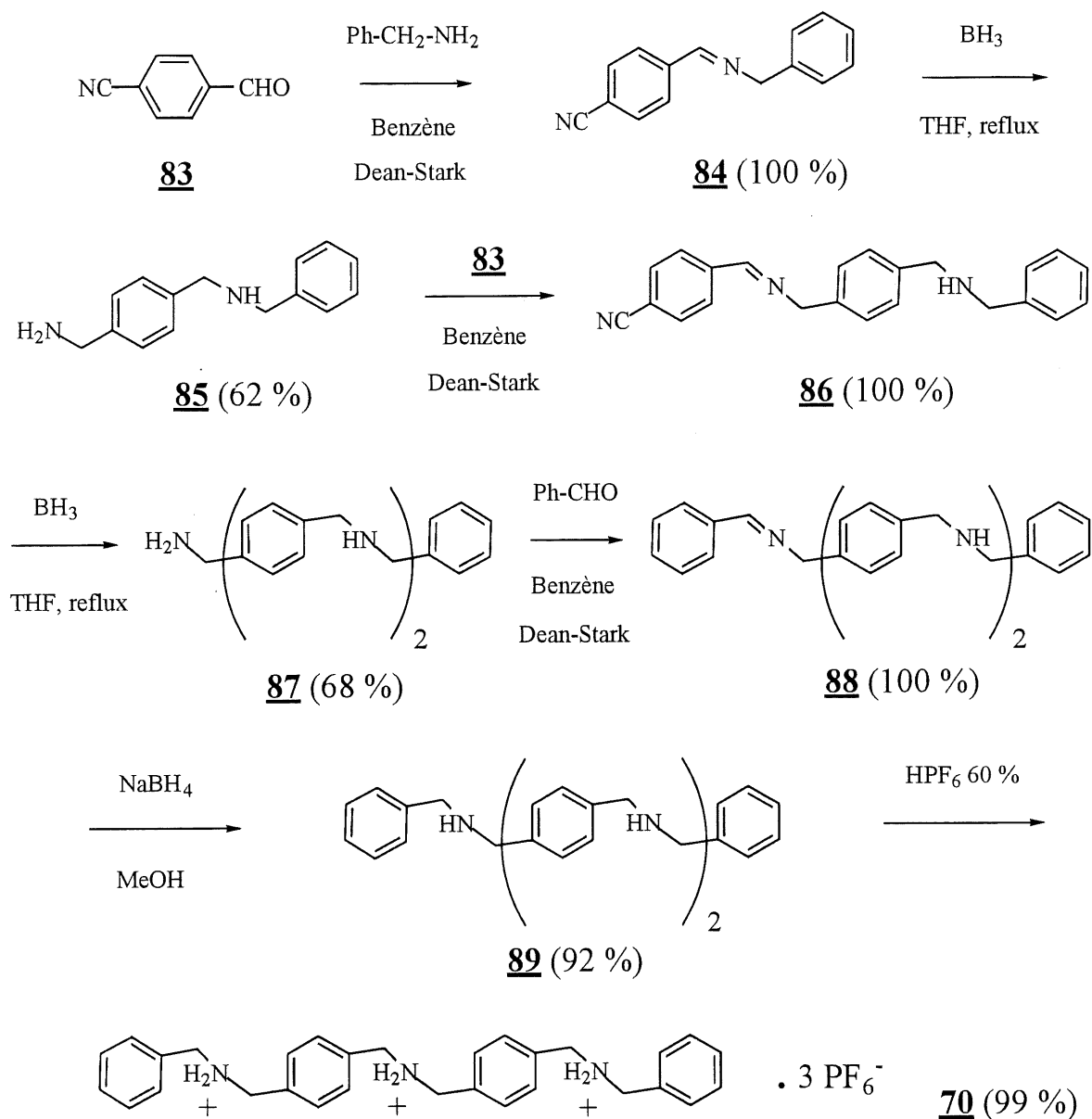
données spectrales et physiques du composé **69** obtenu correspondent à celles décrites dans la littérature.



**Figure 59.** Schéma de synthèse du diammonium-invité DA•2PF<sub>6</sub> **69**

### 1.5.2 Synthèse de TA•3PF<sub>6</sub> **70**

La synthèse de ce composé n'ayant pas été rapportée au début de notre projet, nous avons dû concevoir la stratégie décrite ici (Figure 60) qui ne présente aucune réaction « statistique ».



**Figure 60.** Schéma de synthèse du triammonium-invité TA•3PF<sub>6</sub> **70**

Nous faisons réagir, dans un montage de Dean-Stark, de la benzylamine et du *p*-cyanobenzaldéhyde **83**. La cyanoimine **84** obtenue subit alors une triple réduction en diamine **85** par le complexe borane-THF. Nous faisons



ensuite réagir une nouvelle fois 83, dans les conditions de la première étape, pour introduire le dernier atome d'azote. Suite à une réduction de 86 par le borane, nous obtenons la triamine 87. Celle-ci réagit avec du benzaldéhyde, dans un montage de Dean-Stark, pour conduire à l'imine 88. Cette dernière est réduite en triamine benzylée 89 par le borohydrure de sodium. La synthèse de ce composé a nécessité 6 étapes, avec un rendement global de 39 %. Récemment, Stoddart *et al.* (88c) en ont décrit une synthèse en 9 étapes, à partir d'un composé non commercial.

Nous préparons le sel tri-hexafluorophosphate correspondant  $TA \cdot 3PF_6$  70, selon le protocole utilisé pour 82. Le composé obtenu possède un spectre RMN identique à celui décrit par la littérature.

## 1.6 Conclusion

La synthèse des constituants conçus pour la préparation de [2] pseudorotaxanes impliquant 1) les peptides à 2 éthers-couronne 63, 64, 67, et 68, et  $DA \cdot 2PF_6$  2) les peptides à 3 éthers-couronne 65 et 66, et  $TA \cdot 3PF_6$  3) l'éther-couronne BOC-BEC-OMe 80 et  $DA \cdot 2PF_6$  (dans le cas de cette expérience de contrôle, nous formerions un [3]pseudorotaxane) a été effectuée et tous les produits caractérisés.

Nous pouvons envisager la préparation des *complexes*. Ce terme sera employé jusqu'à l'obtention de preuves démontrant la formation de pseudorotaxanes.

## CHAPITRE 2

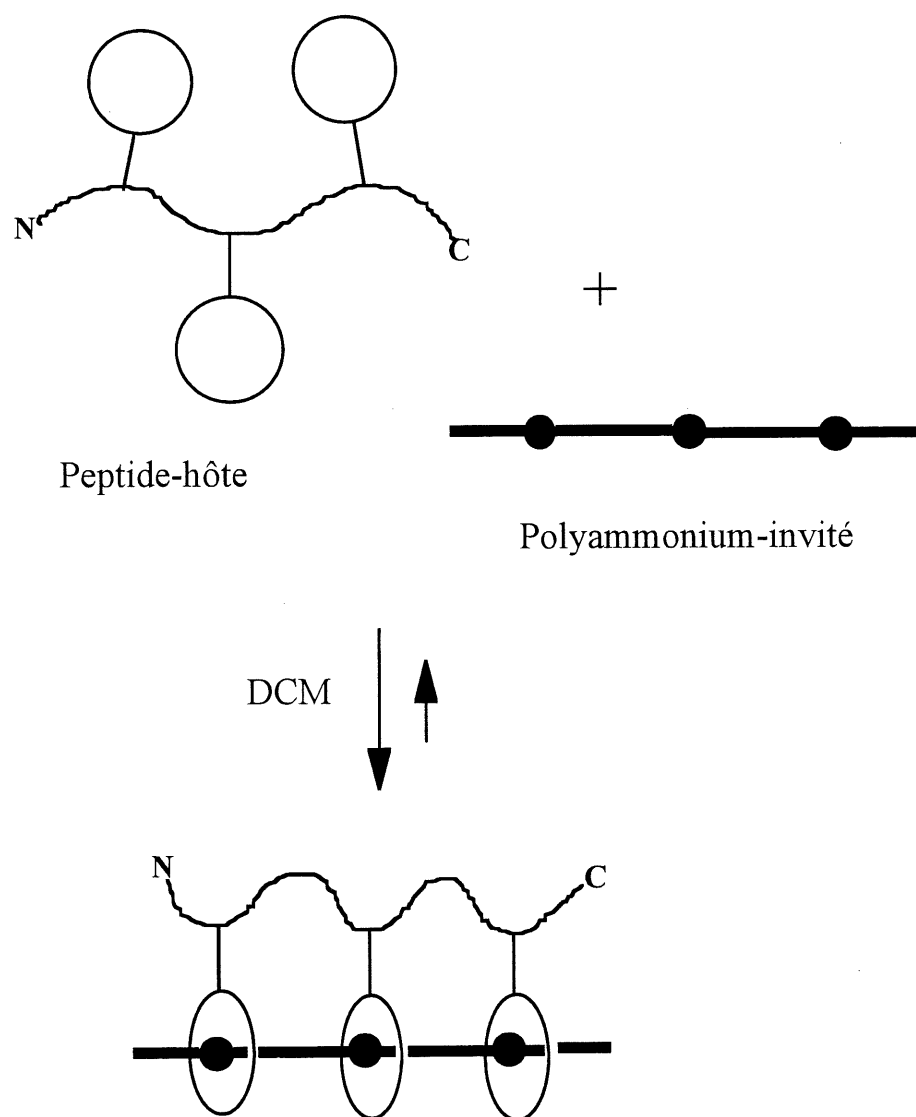
### PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES COMPLEXES

#### 2.1 Préparation des complexes

La préparation des complexes implique le choix d'un solvant adéquat. Il apparaît logique de prendre un solvant dans lequel un des deux constituants est insoluble, de façon à déplacer l'équilibre dans le sens de la formation du complexe (Figure 61), pour autant que celui-ci soit soluble dans le dit solvant. Nous avons opté pour un solvant dans lequel les peptides seront solubles et pas les sels d'ammoniums. Stoddart *et al.* rapportent que les sels  $\text{DA} \cdot 2\text{PF}_6$  ou  $\text{TA} \cdot 3\text{PF}_6$  sont quasiment insolubles dans les solvants halogénés (80,88c). Or, nos peptides sont solubles (**65**, **66** et **68**) ou un peu solubles (**63**, **64** et **67**) dans le chloroforme ou le DCM. Ce sont donc ces solvants qui ont été utilisés pour la formation des complexes.

Selon un protocole général, nous dissolvons le peptide ou BOC-BEC-OMe **80** dans un minimum de solvant halogéné, puis ajoutons un équivalent de sel  $\text{DA} \cdot 2\text{PF}_6$  ou  $\text{TA} \cdot 3\text{PF}_6$ , suivant le cas. La suspension est soumise à 2 minutes de sonication, puis est agitée pendant une dizaine d'heures. Ensuite, la solution légèrement voilée est filtrée à l'aide d'un filtre de 45  $\mu\text{m}$  et le solvant est évaporé sous vide, dans un dessiccateur. Quel que soit le peptide impliqué, nous obtenons déjà un bon indice de la formation de complexes par le fait que

nous observons une bonne solubilisation du sel. Ce n'est pas le cas avec BOC-BEC-OMe, où le sel reste principalement en suspension.



**Figure 61.** Schéma de préparation des complexes

Nous résumons dans le Tableau 5 nos observations sur la solubilité des composés.

**Tableau 5.** Solubilité des composants des pseudorotaxanes dans le dichlorométhane (DCM)

Composé	Solubilité (DCM)		
	Hôte seul	Invité seul	Complexe
2 <u>80</u> + DA•2PF <sub>6</sub>	***	aucune	***
<u>63</u> + DA•2PF <sub>6</sub>	**	aucune	**
<u>64</u> + DA•2PF <sub>6</sub>	**	aucune	**
<u>65</u> + TA•3PF <sub>6</sub>	***	aucune	***
<u>66</u> + TA•3PF <sub>6</sub>	***	aucune	***
<u>67</u> + DA•2PF <sub>6</sub>	*	aucune	**
<u>68</u> + DA•2PF <sub>6</sub>	***	aucune	**

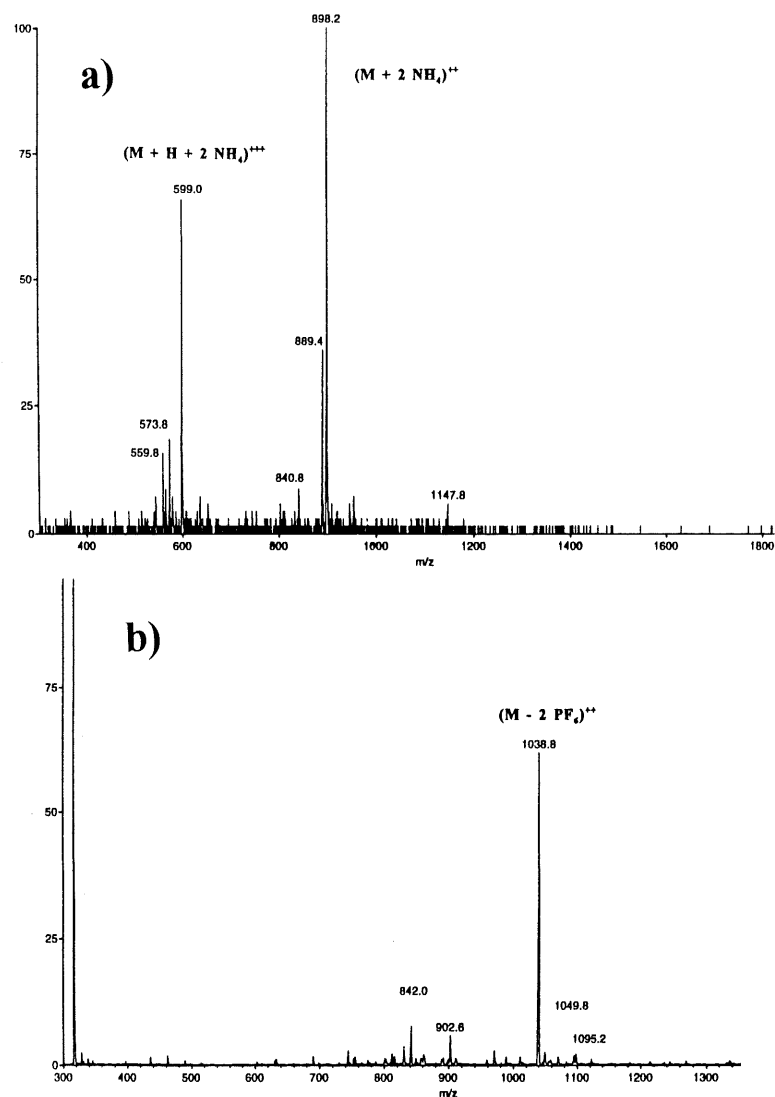
(\*\*\*) très soluble; (\*\*) moyennement soluble; (\*) peu soluble

Le résidu sec obtenu est repris par un solvant deutérié, dans le cas d'études par RMN <sup>1</sup>H, ou envoyé tel quel aux analyses par spectrométrie de masse.

Nous avons également réussi à préparer le complexe [63•DA]•2PF<sub>6</sub> par extraction d'une solution aqueuse du sel DA•2PF<sub>6</sub>, à l'aide d'une solution du

peptide **63** dans le DCM. Par RMN, le complexe ainsi préparé ne présentait aucune différence avec celui obtenu par la méthode décrite ci-dessus.

## 2.2 Caractérisation des complexes par spectrométrie de masse



**Figure 62.** Spectres de masse ES a) du peptide **63** b) du complexe  $[63 \cdot DA] \cdot 2PF_6$

Chaque complexe a été analysé par spectrométrie de masse ES. Cette technique très douce permet d'observer facilement les ions moléculaires de composés de masse élevée et est très précise. Son seul relatif inconvénient est qu'elle produit des ions à plusieurs charges.

Nous pouvons voir sur la Figure 62 le résultat obtenu dans le cas du complexe **[63•DA]•2PF<sub>6</sub>**, comparé au peptide libre **63**. Les autres spectres de masse sont rapportés en Annexe et les résultats sont compilés dans le Tableau 6.

**Tableau 6.** Caractérisation des complexes par spectrométrie de masse ES

Complexe	Formule	Masse calculée (M)	Masse trouvée	Attribution
<b>[(80)<sub>2</sub>•DA]•2PF<sub>6</sub></b>	C <sub>82</sub> H <sub>106</sub> N <sub>4</sub> O <sub>21</sub> P <sub>2</sub> F <sub>12</sub>	1745	1555	M - 2 PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>
<b>[63•DA]•2PF<sub>6</sub></b>	C <sub>114</sub> H <sub>168</sub> N <sub>10</sub> O <sub>25</sub> P <sub>2</sub> F <sub>12</sub>	2368	2078	M - 2 PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>
<b>[64•DA]•2PF<sub>6</sub></b>	C <sub>120</sub> H <sub>179</sub> N <sub>11</sub> O <sub>26</sub> P <sub>2</sub> F <sub>12</sub>	2481	2191	M - 2 PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>
<b>[65•TA]•3PF<sub>6</sub></b>	C <sub>167</sub> H <sub>246</sub> N <sub>15</sub> O <sub>37</sub> P <sub>3</sub> F <sub>18</sub>	3490	3065	M - 3 PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>
			3200	M - 2 PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>
<b>[66•TA]•3PF<sub>6</sub></b>	C <sub>179</sub> H <sub>268</sub> N <sub>17</sub> O <sub>39</sub> P <sub>3</sub> F <sub>18</sub>	3716	3281	M - 3 PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>
			3426	M - 2 PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>
<b>[67•DA]•2PF<sub>6</sub></b>	C <sub>110</sub> H <sub>158</sub> N <sub>10</sub> O <sub>25</sub> P <sub>2</sub> F <sub>12</sub>	2312	2022	M - 2 PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>
<b>[68•DA]•2PF<sub>6</sub></b>	C <sub>110</sub> H <sub>156</sub> N <sub>10</sub> O <sub>25</sub> P <sub>2</sub> F <sub>12</sub>	2310	2020	M - 2 PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>

Les résultats de spectrométrie de masse constituent une preuve de la formation de complexes 1:1 dans le cas de tous les peptides et même de l'éther-couronne 80. Ces complexes sont suffisamment stables pour exister en phase gazeuse. Il est frappant de constater la netteté des spectres dans le cas des complexes  $[63 \cdot DA] \cdot 2PF_6$ ,  $[64 \cdot DA] \cdot 2PF_6$ ,  $[67 \cdot DA] \cdot 2PF_6$  et  $[68 \cdot DA] \cdot 2PF_6$  qui n'a rien à envier à celle observée pour les peptides libres. Dans tous ces exemples nous obtenons un ion doublement chargé très intense, qui correspond à la masse du complexe ayant perdu ses deux contre-ions ( $M - 2 PF_6^-$ ). De plus, il n'y a aucune trace visible 1) de complexe 1:2  $[Peptide \cdot (DA)_2] \cdot 4PF_6$  qui produirait facilement un ion doublement chargé par perte de 2 contre-ions 2) de complexe 1:1 monochargé qui pourrait correspondre à une complexation partielle du diammonium par un seul éther couronne.

Les résultats restent très bons dans le cas des complexes de niveau supérieur  $[65 \cdot TA] \cdot 3PF_6$  et  $[66 \cdot TA] \cdot 3PF_6$ , avec l'obtention d'un ion triplement chargé correspondant à la masse du complexe ayant perdu ses trois contre-ions ( $M - 3 PF_6^-$ ). Mais l'observation d'un ion doublement chargé attribuable à ( $M - 2 PF_6^-$ ) indique quant à lui l'existence de complexes partiels; c'est à dire, la complexation du triammonium par seulement deux éthers-couronne. De plus, les spectres moins nets sont un indice de la présence de plusieurs espèces dans le milieu.

Enfin, les moins bons résultats sont obtenus dans le cas de BOC-BEC-OMe, où clairement plusieurs espèces coexistent (complexes 1:1 et 2:1, entre autres). Ceci était certes attendu, voire même souhaité. En effet, il est entropiquement moins favorable de former des complexes 2:1 que 1:1. Et l'observation d'une faible extraction du sel  $DA \cdot 2PF_6$  par l'éther-couronne laissait présager de ce résultat.

Nous pouvons tirer de précieuses informations de ces spectres de masse et aussi d'encourageants indices: 1) tous les peptides forment des complexes 1:1 avec leur invité approprié; 2) ces complexes sont stables; 3) nous semblons clairement bénéficier d'un effet de coopérativité très fort quand on compare les résultats obtenus respectivement avec les peptides et avec l'éther-couronne seul.

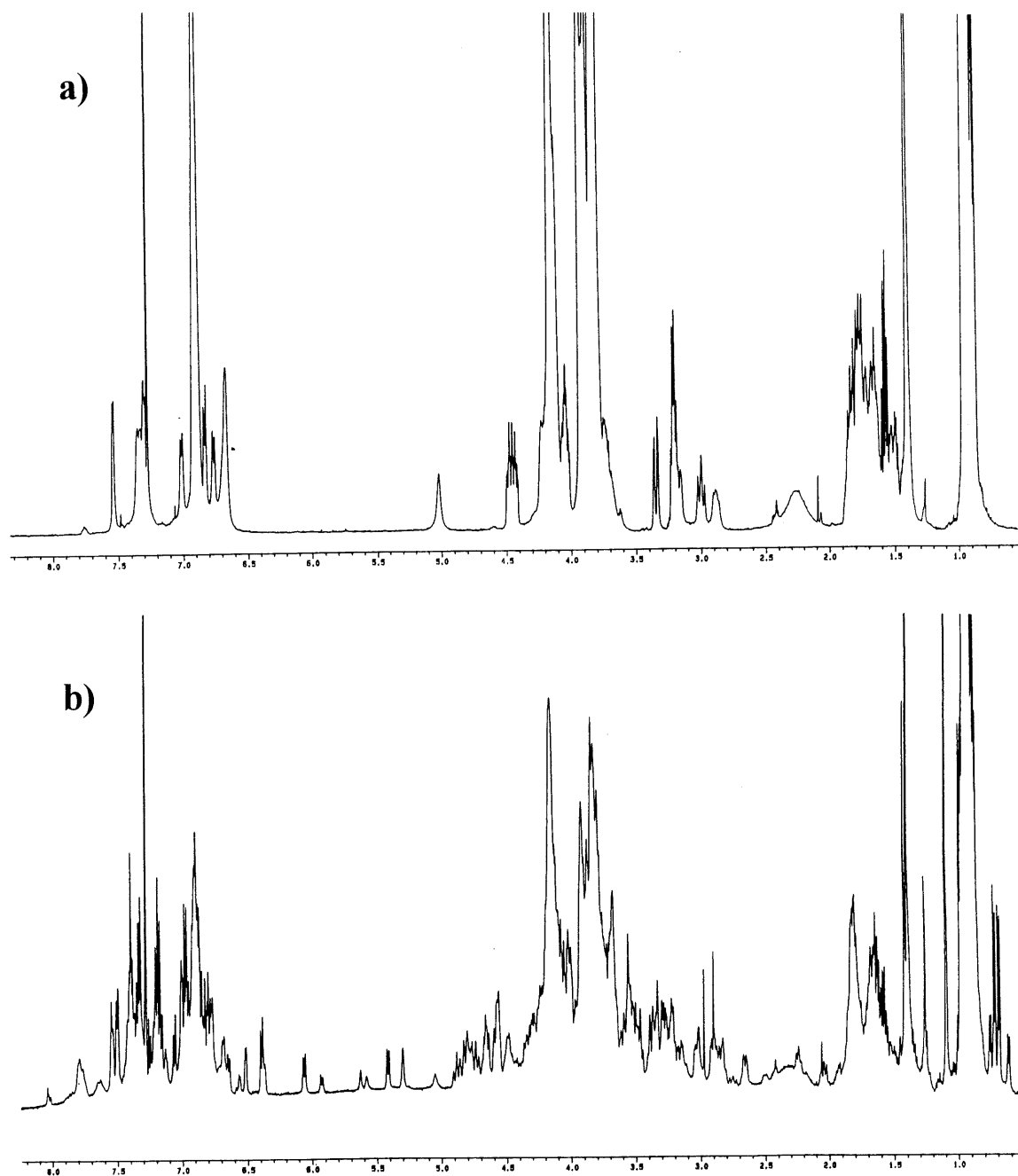
Nous avons démontré la formation de complexes entre des DB24C8, portés par des peptides, et des diammoniums secondaires benzyliques. Or, les informations données par la littérature à ce sujet (80), associées à la fabrication de modèles moléculaires CPK, semblent clairement indiquer que ces complexes ne peuvent être que de type pseudorotaxane. Nous attendrons, cependant la confirmation par d'autres études, dont la RMN, pour pouvoir conclure de façon plus catégorique.

## 2.3 Caractérisation des complexes par RMN $^1\text{H}$ 500 MHz

### 2.3.1 Complexe [63•DA]•2PF<sub>6</sub>

Nous présentons dans la Figure 63 les spectres RMN  $^1\text{H}$  du peptide 63 libre et du complexe [63•DA]•2PF<sub>6</sub> dans le chloroforme. Qualitativement, les changements spectaculaires induits par la formation du complexe sont interprétables par une rigidification du système. Ce phénomène est attendu dans le cas de la formation d'un pseudorotaxane. Nous nous sommes intéressés à deux groupes de pics qui ne sont observés que dans le spectre du complexe: 1) les pics fins et bien différenciés entre 5.2 et 6.7 ppm 2) les massifs entre 4.2 et 4.9 ppm.





**Figure 63.** Spectre RMN 500 MHz dans le chloroforme du a) peptide **63** b) complexe  $[\mathbf{63} \cdot \text{DA}] \cdot 2\text{PF}_6$

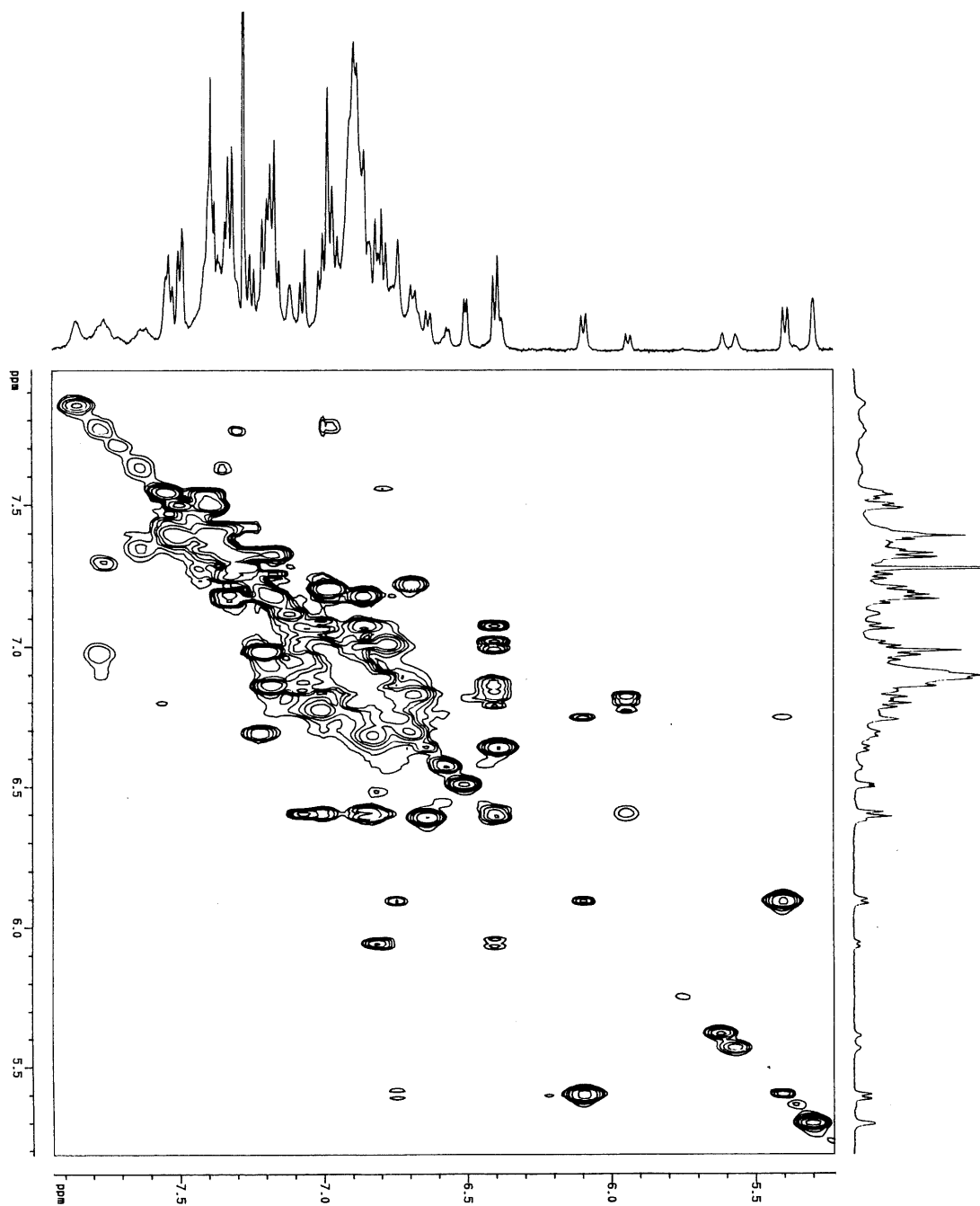
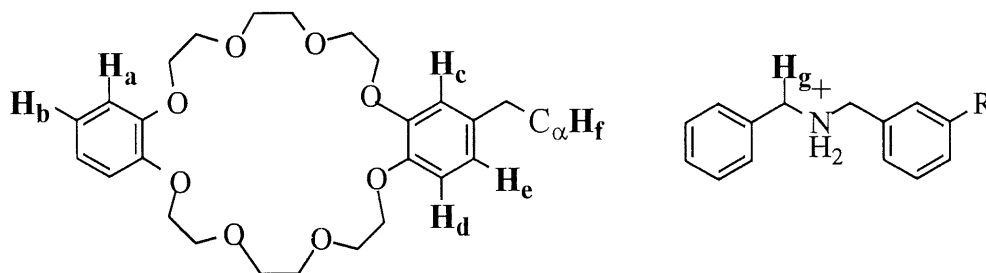


Figure 64. Spectre TOCSY partiel du complexe  $[63\cdot DA]\cdot 2PF_6$

L'attribution rigoureuse de ces pics est assez difficile, vu le nombre de résidus identiques que contient le peptide et le mélange d'espèces différentes vraisemblablement présentes dans la solution. Néanmoins, des expériences de « *Correlated total SpectroscopY* » (COSY) et de « *TOTAL Coherence transfert SpectroscopY* » (TOCSY) nous ont fourni des renseignements permettant d'identifier la nature des protons résonnant dans ces régions (Figure 64). De plus, les nombreuses études du groupe de Stoddart sur la complexation de ce type de polyammoniums nous indiquent que les protons des méthylènes benzyliques résonnent à 4.4-4.7 ppm (en fonction du solvant utilisé) lorsqu'ils appartiennent à des espèces complexées (80,88a).

**Tableau 7.** Attribution partielle des déplacements chimiques des protons du complexe  $[6.3 \cdot DA] \cdot 2PF_6$  en RMN  $^1H$  dans le chloroforme



$\delta$ (ppm)	Corrélations ( $\delta$ )	Attribution
m, 4.25	NH-BEC (6.95); C $\beta$ H <sub>2</sub> -BEC (3.40)	H <sub>f</sub>
m,	1) NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> (7.45-7.60)	H <sub>g</sub>
4.45-4.55	2) H aliphatiques (1.40, 1.70 et 3.80)	C $\alpha$ H-Leu

$\delta$ (ppm)	Corrélations	Attribution
m, 4.65	NH-BEC (6.95); C $\beta$ H <sub>2</sub> -BEC (3.50)	H <sub>f</sub>
m, 4.70-4.90	NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> (7.60-7.80)	H <sub>g</sub>
s, 5.05		NH-BOC
s, 5.32	H aliphatiques	NH-Leu
d, 5.40	H Ar (6.10); H Ar (6.75)	H <sub>e</sub> -BEC 1
2 s, 5.60	H aliphatiques	NH-Leu
d, 5.95	H Ar (6.40); H Ar (6.82)	H <sub>e</sub> -BEC 2
d, 6.10	H Ar (5.40); H Ar (6.75)	H <sub>d</sub> -BEC 1
m, 6.37-6.41	1) H Ar (5.95); H Ar (6.82) 2) H Ar (6.63)	H <sub>d</sub> -BEC 2 H <sub>a</sub>
d, 6.51	H aliphatiques (1.15, 1.40 et 3.50)	NH- <i>n</i> -Pr
m, 6.57		NH
d, 6.63	H Ar (6.38)	H <sub>b</sub>
s, 6.75	H Ar (5.40); H Ar (6.10)	H <sub>e</sub> -BEC 1

Nous avons donc attribué ces signaux aux: 1) N-H de liens peptidiques et protons aromatiques des éthers-couronne 2) protons benzyliques des invités et C $\alpha$ -H des éthers-couronne, assortis de quelques C $\alpha$ -H des leucines. La plupart

appartient à des espèces complexées. Les résultats plus détaillés sont consignés dans le Tableau 7.

Ces changements de déplacement chimique sont indicatifs de l'environnement très modifié dans lequel se retrouvent certains groupements du complexe, de même que des contraintes exercées sur le squelette peptidique. Le fort effet de blindage que subissent certains protons aromatiques pourrait provenir de leur positionnement dans un cône d'anisotropie lors d'un empilement  $\pi$ - $\pi$  aromatique (*cf.* Figure 57). Stoddart *et al.* (98) ont déjà rapporté un exemple similaire qui se produisait lors de la préparation d'un pseudorotaxane à l'aide de composés comportant des cycles aromatiques. Quant aux protons des méthylènes benzyliques de l'invité, ils subiraient un fort déplacement vers les bas champs résultant de la formation de liens hydrogène  $[N^+-C-H...O]$ .

Ces résultats confortent un peu plus l'hypothèse de la formation d'un [2]pseudorotaxane dans le cas du complexe  $[63 \cdot DA] \cdot 2PF_6$ .

### 2.3.2 Complexe $[64 \cdot DA] \cdot 2PF_6$

La comparaison entre les spectres du peptide libre et complexé (Figure 65) révèle moins de changements drastiques que dans le cas de **63**. Il semblerait que sous forme complexée à  $DA \cdot 2PF_6$ , **64** subisse moins de contraintes conformationnelles que son homologue. Néanmoins, des modifications notables apparaissent dans les zones de déplacement chimique des protons des éthers-couronne: 3.0-3.5 ppm pour les protons des méthylènes benzyliques; 4.5 ppm pour les  $C\alpha-H$  et 6.5-7.0 ppm pour les protons aromatiques. Ces observations sont révélatrices des interactions qui se

produisent. De plus, l'apparition d'un massif à 4.7 ppm sur le spectre du complexe  $[64\cdot DA]\cdot 2PF_6$  est une indication supplémentaire que le diammonium est impliqué dans une structure de pseudorotaxane. Cependant, la quasi-absence de pics dans la zone 5.2-6.5 ppm semble indiquer que les interactions aromatique-aromatique observées avec  $[63\cdot DA]\cdot 2PF_6$  ne sont pas mises en jeu lors de la formation du complexe  $[64\cdot DA]\cdot 2PF_6$ .

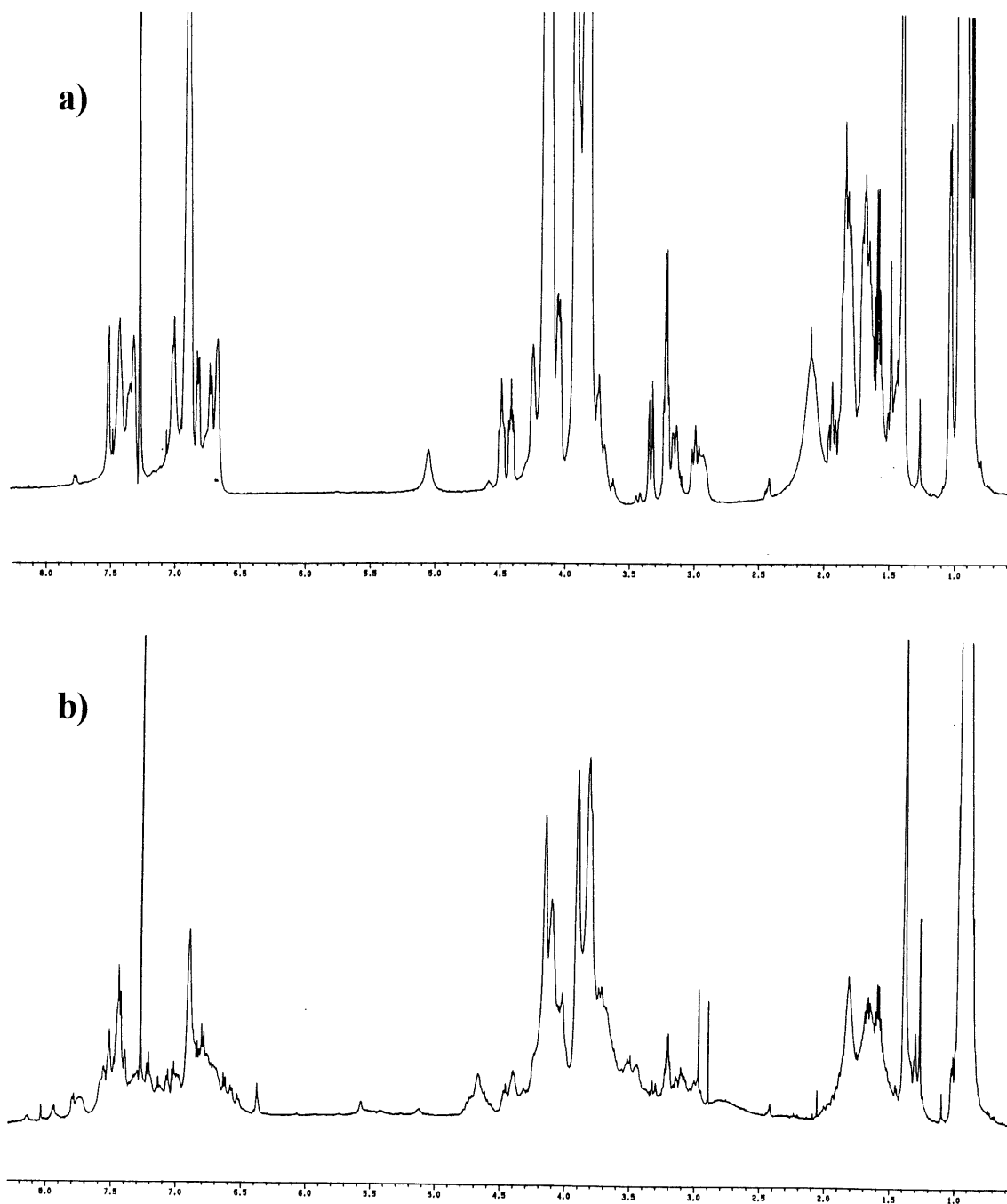
### 2.3.3 Complexes $[65\cdot TA]\cdot 3PF_6$ et $[66\cdot TA]\cdot 3PF_6$

Le plus grand nombre de résidus contenu dans ces peptides rend les informations livrées par la RMN d'une portée beaucoup plus limitée. Nous présentons dans la Figure 66 le cas du peptide **66** et du complexe  $[66\cdot TA]\cdot 3PF_6$ . Les différences flagrantes entre les spectres du peptide libre et complexé sont: 1) les modifications dans les massifs des protons des méthylènes benzyliques (3.2 ppm) et C $\alpha$ -H (4.4 ppm) des éthers-couronne 2) l'apparition d'un massif à 4.7 ppm sur le spectre du complexe.

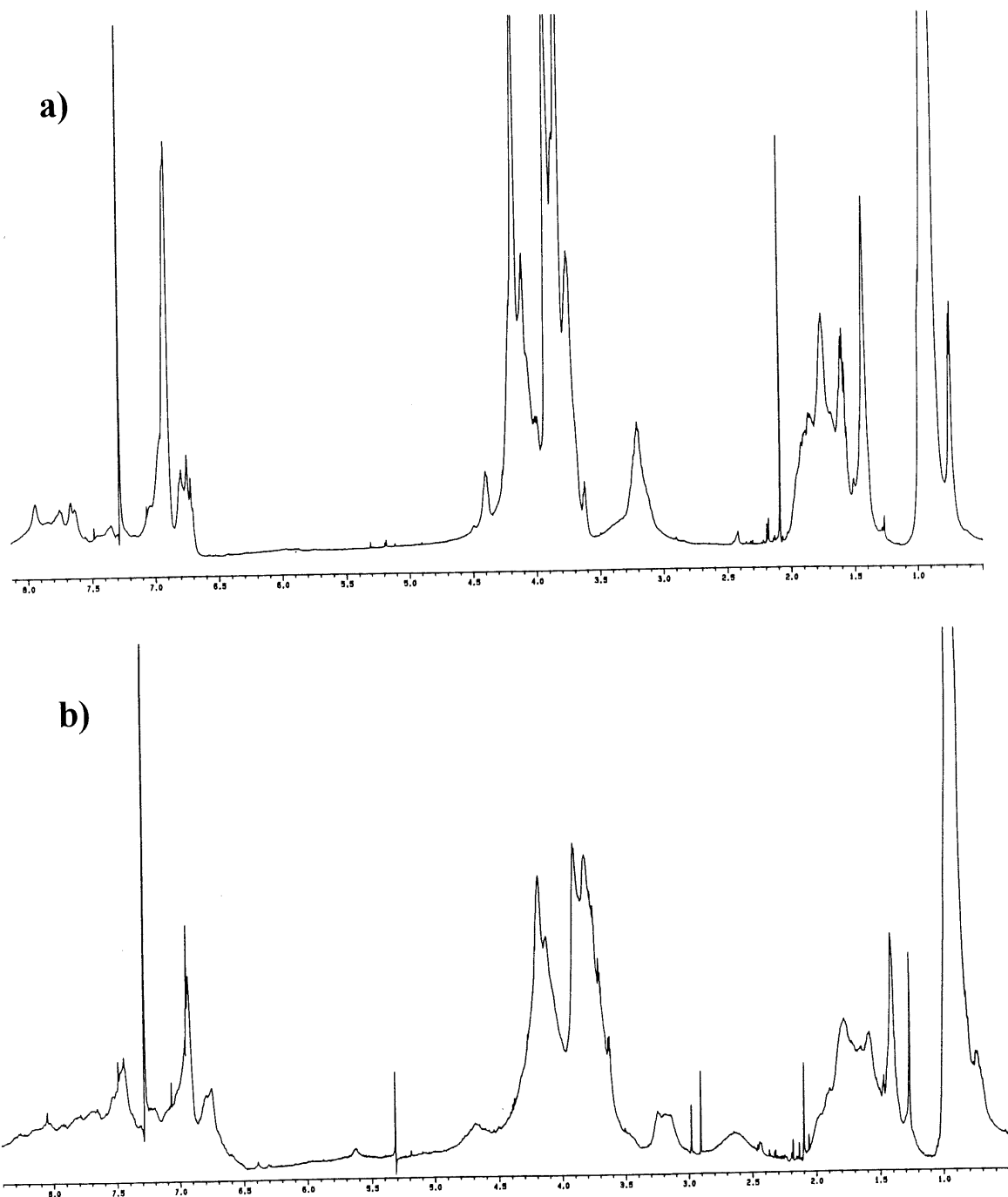
De ce fait, les conclusions à tirer sont semblables à celles dictées par l'étude du complexe  $[64\cdot DA]\cdot 2PF_6$ . Il semble bien qu'une complexation se produise mais qu'elle n'engendre pas de modification conformationnelle majeure dans le squelette peptidique.

### 2.3.4 Complexe $[67\cdot DA]\cdot 2PF_6$

Tirant parti de la meilleure solubilité de ces heptapeptides dans l'acétonitrile, nous avons étudié les complexes formés par les peptides **67** et **68** dans ce solvant.

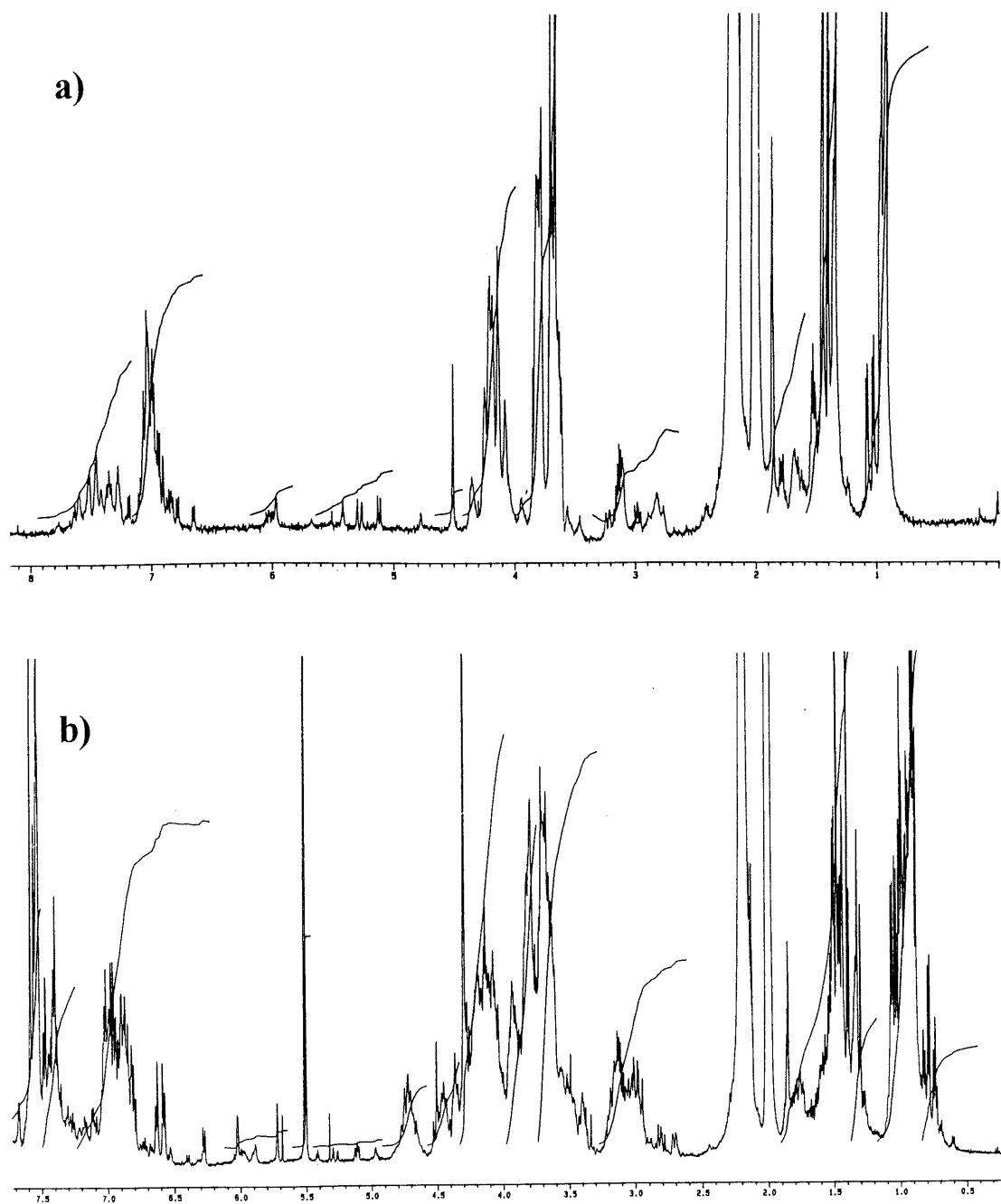


**Figure 65.** Spectre RMN 500 MHz dans le chloroforme du a) peptide **64** b) complexe **[64•DA]•2PF<sub>6</sub>**



**Figure 66.** Spectre RMN 500 MHz dans le chloroforme du a) peptide **66** b) complexe **[66•TA]•3PF<sub>6</sub>**





**Figure 67.** Spectre RMN 500 MHz dans l'acétonitrile du a) peptide **67** b) complexe **[67·DA]·2PF<sub>6</sub>**

Ceci permet d'établir des éléments de comparaison avec les études de DC présentées dans le chapitre 3. Le sel DA•2PF<sub>6</sub> étant également soluble dans ce solvant, nous avons ainsi l'assurance d'être en présence d'une quantité équimolaire d'hôte et d'invité dans la solution. De plus, le groupe de Stoddart (80,88a) a utilisé principalement l'acétonitrile lors de ses études par RMN, pour ces mêmes raisons de solubilité, mais également pour ne pas être gêné par la présence du pic résiduel de solvant dans les régions d'intérêt du spectre des complexes.

Nous présentons dans la Figure 67 les spectres RMN de **67** et [**67**•DA]•2PF<sub>6</sub> dans CD<sub>3</sub>CN. Nous résumons dans le Tableau 8 les attributions relatives aux divers acides aminés, rendues possibles par des expériences complémentaires de TOCSY et de COSY.

**Tableau 8.** Étude du peptide **67** par RMN <sup>1</sup>H dans l'acétonitrile

	$\delta$ (ppm)				
Résidu	N-H	C $\alpha$ -H	C $\beta$ -H	C $\gamma$ -H	C $\delta$ -H
BOC-Leu	5.98	3.95	1.52 (CH <sub>2</sub> )	1.70 (CH)	0.95 (2 CH <sub>3</sub> )
BEC 1	7.35	4.34	3.02 et 3.25 (CH <sub>2</sub> )		
Ala	7.60	4.05	1.36 (CH <sub>3</sub> )	X	X

$\delta$ (ppm)					
Résidu	N-H	C $\alpha$ -H	C $\beta$ -H	C $\gamma$ -H	C $\delta$ -H
Val	7.29	3.79	2.23 (CH)	1.03 et 1.07 (2 CH <sub>3</sub> )	X
Ile	7.27	4.08	1.90 (CH)	? (CH <sub>2</sub> ) 0.99 (CH <sub>3</sub> )	0.95 (CH <sub>3</sub> )
BEC 2	7.42	4.36	3.11 (CH <sub>2</sub> )		
Leu 2	7.38	4.26	1.70 (CH <sub>2</sub> )	1.85 (CH)	0.96 (2 CH <sub>3</sub> )
NH- <i>n</i> -Pr	6.98	3.15 (CH <sub>2</sub> )	1.55 (CH <sub>2</sub> )	0.93 (CH <sub>3</sub> )	

Lors de la formation du complexe, nous notons cette fois encore de nombreux changements dans l'allure du spectre RMN. Un élargissement des signaux attribués aux protons des couronnes est observé à: 6.5-7.0 ppm (aromatiques); 3.5-4.4 ppm (CH<sub>2</sub> des couronnes) et 2.9-3.3 ppm (CH<sub>2</sub> benzyliques).

Plus intéressant, nous voyons clairement apparaître les massifs centrés sur 4.7 et 4.4 ppm, attribués par Stoddart *et al.* (80) aux protons des méthylènes des invités complexés. Le grand pic fin à 4.22 ppm correspond à ces mêmes groupements, mais dans les espèces libres.

Ces attributions sont confirmées par des expériences de TOCSY et de COSY. L'assignation complète des déplacements chimiques s'avère cependant une tâche très ardue.

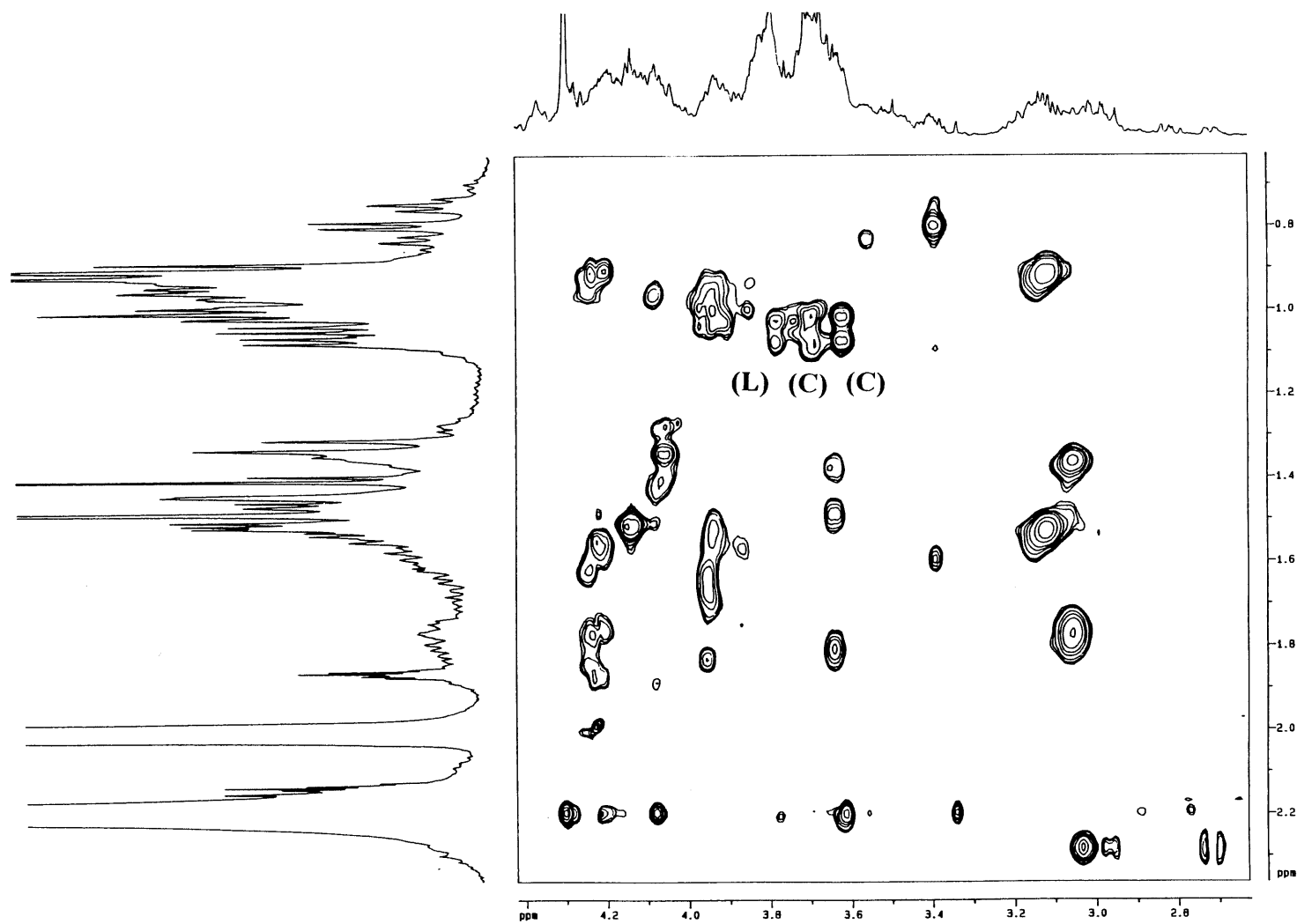


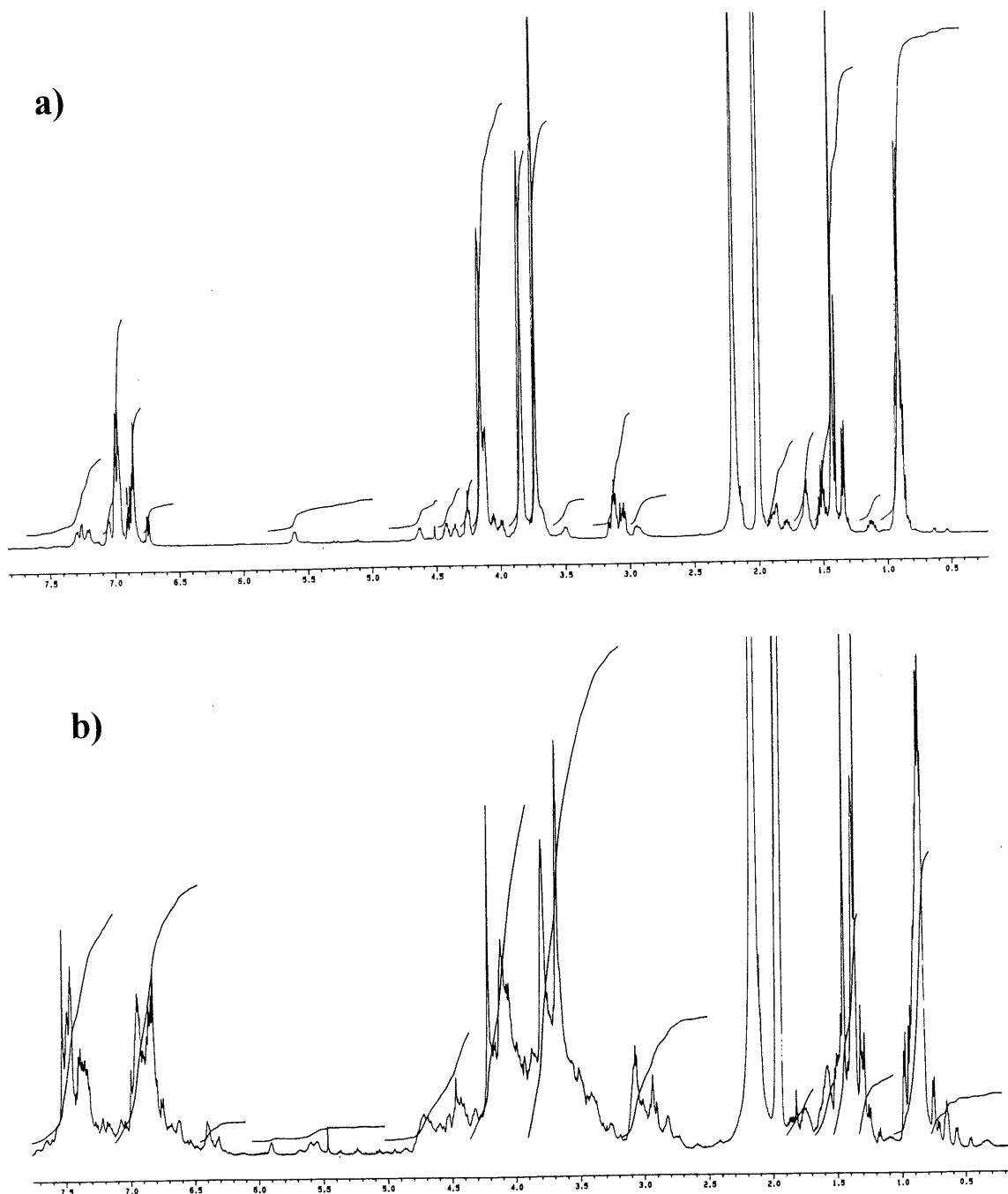
Figure 68. Spectre TOCSY partiel du complexe  $[67\cdot\text{DA}]\cdot 2\text{PF}_6$

Néanmoins, nous pouvons caractériser l'appartenance de certains acides aminés à des espèces complexées ou libres. La Figure 68 montre une zone du spectre TOCSY du complexe, dans laquelle on peut identifier les résidus valine, grâce aux corrélations caractéristiques entre les protons du carbone- $\alpha$  et des méthyles- $\gamma$  appartenant aux espèces libre (notée L) ou complexées (notées C). Une comparaison avec le spectre du peptide libre nous permet de les distinguer sans peine. Le fait de voir deux signaux attribuables à des espèces complexées sera discuté plus loin, lors de l'étude du complexe  $[68 \cdot \text{DA}] \cdot 2\text{PF}_6$ .

Un autre massif a attiré notre attention: il s'agit des deux doublets qui couplent ensemble ( $J = 7.8$  Hz), centrés sur 6.6 ppm. Leur aspect est nettement celui de protons appartenant à un cycle aromatique para-disubstitué. Or, seul le diammonium possède un tel groupement. Le déplacement chimique observé (dans le sel libre, ces protons résonnent aux alentours de 7.5 ppm dans l'acétonitrile), ainsi que la différenciation des protons sont révélateurs du fait qu'il appartient à un complexe.

### 2.3.5 Complexe $[68 \cdot \text{DA}] \cdot 2\text{PF}_6$

La très bonne solubilité du peptide **68** dans l'acétonitrile nous permet d'obtenir un spectre très clair (Figure 69). Nous résumons les assignations correspondant aux différents résidus dans le Tableau 9. Celles-ci ont également été rendues possibles grâce aux expériences RMN à deux dimensions.



**Figure 69.** Spectre RMN 500 MHz dans l'acétonitrile du a) peptide **68** b) complexe **[68·DA]·2PF<sub>6</sub>**

**Tableau 9.** Étude du peptide **68** par RMN  $^1\text{H}$  dans l'acétonitrile

	$\delta$ (ppm)				
Résidu	N-H	C $\alpha$ -H	C $\beta$ -H	C $\gamma$ -H	C $\delta$ -H
<b>BOC-Leu</b>	5.61	3.99	1.44 (CH <sub>2</sub> )	1.63 (CH)	0.92 (2 CH <sub>3</sub> )
<b>BEC 1</b>	7.29	4.43	3.08 et 3.15 (CH <sub>2</sub> )		
<b>Ala</b>	7.26	4.06	1.35 (CH <sub>3</sub> )	X	X
<b>Pro</b>	X	4.26	1.80 et 2.18 (CH <sub>2</sub> )	1.87 (CH <sub>2</sub> )	3.50 et 3.68 (CH <sub>2</sub> )
<b>Ile</b>	7.06	4.37	1.87 (CH)	1.14 et 1.50 (CH <sub>2</sub> )	0.89 (CH <sub>3</sub> ) 0.92 (CH <sub>3</sub> )
<b>BEC 2</b>	7.05	4.63	2.96 et 3.06 (CH <sub>2</sub> )		
<b>Leu 2</b>	7.20	4.26	1.65 (CH <sub>2</sub> )	1.65 (CH)	0.95 (2 CH <sub>3</sub> )
<b>NH-<i>n</i>-Pr</b>	6.85	3.13 (CH <sub>2</sub> )	1.52 (CH <sub>2</sub> )	0.92 (CH <sub>3</sub> )	

Lorsque  $\text{DA} \cdot 2\text{PF}_6$  est ajouté à la solution de **68** dans l'acétonitrile, nous notons un net élargissement des signaux attribuables aux protons des BEC. De plus, la présence des massifs aux alentours de 4.4-4.8 ppm révèle bien la complexation des invités. Encore une fois, nous avons la confirmation que cette complexation est bien un équilibre de par la présence du pic à 4.22 ppm, caractéristique du sel d'ammonium libre en solution.

Une étude par COSY et TOCSY nous a permis de mettre en évidence la présence d'au moins 4 groupements de signaux attribuables aux BEC complexés. Ceci est montré sur la Figure 70. Les BEC sont assez aisément identifiables puisqu'ils présentent une corrélation en COSY de par le couplage  $^3\text{J}$  entre le proton du carbone- $\alpha$  et les deux protons du méthylène benzylique. Ces derniers étant diastéréotopiques, ils apparaissent très différenciés. Cela conduit à une corrélation double entre des protons résonnant vers 4.0 ppm et d'autres à 3.0-3.5 ppm, qui est unique sur le spectre. Ce dernier révèle la présence des deux BEC non complexés (notés L). Dans leur cas, les protons benzyliques sont peu différenciés (*cf.* spectre du peptide libre). Tandis que l'on note au moins 4 corrélations doubles supplémentaires qui n'apparaissent que sur le spectre du complexe; donc, attribuables aux couronnes complexées (notés C). Leur caractéristique commune est un fort blindage subit par les  $\text{C}\alpha\text{-H}$  et une forte différenciation des protons benzyliques, compatible avec un phénomène de rigidification du système.



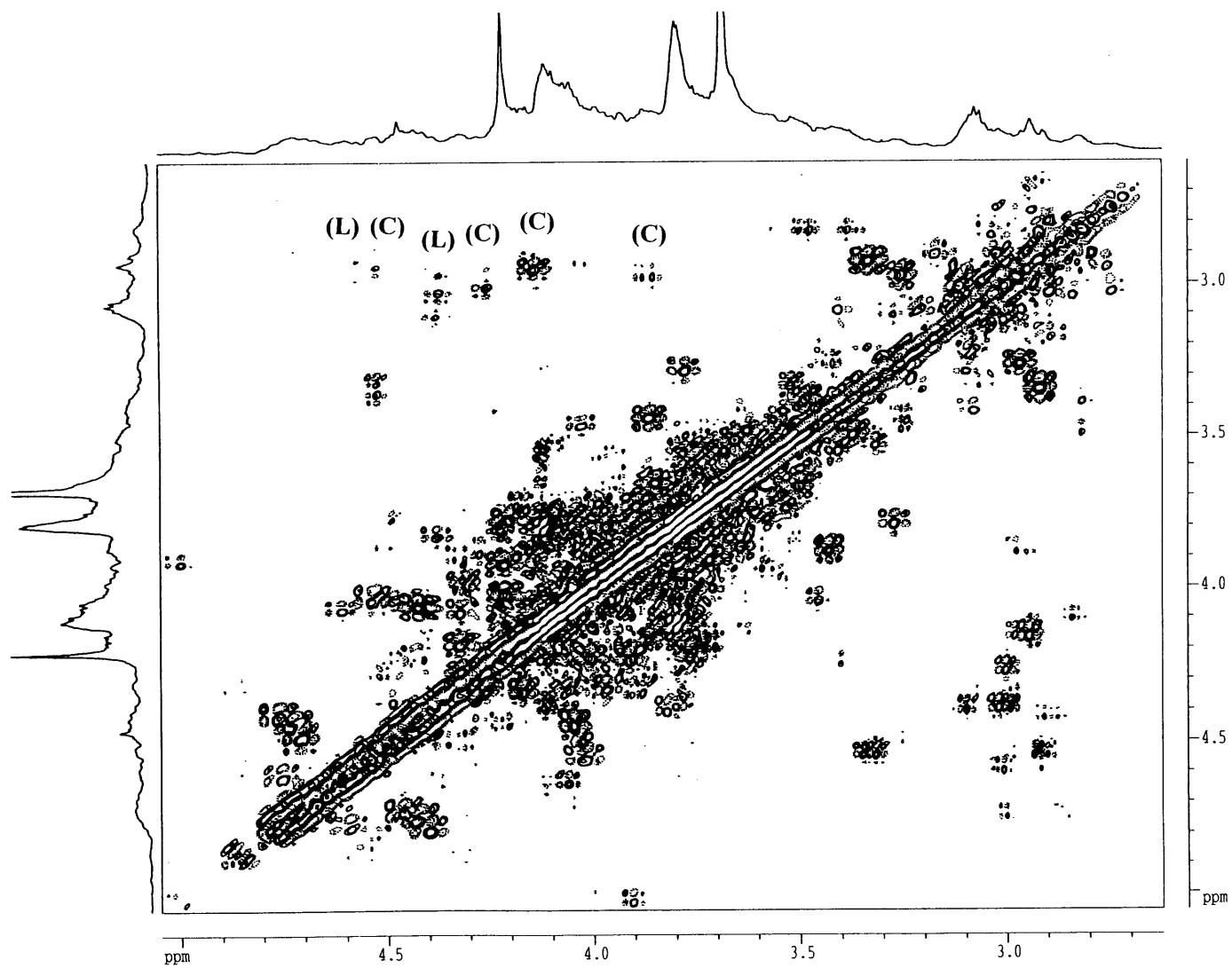
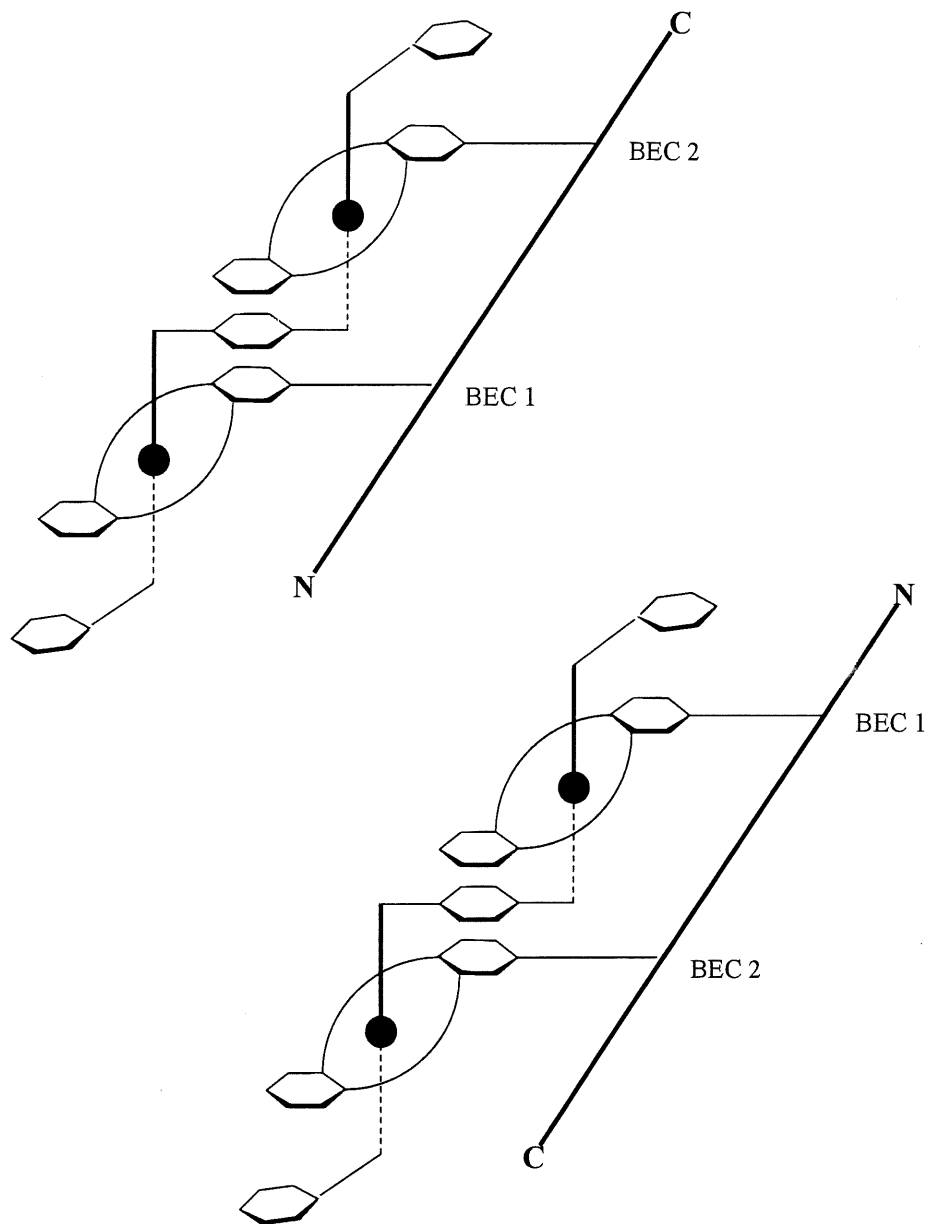


Figure 70. Spectre COSY partiel du complexe  $[68 \cdot \text{DA}] \cdot 2\text{PF}_6$

## 2.4 Conclusion

La RMN nous a permis de mettre en évidence de façon indiscutable la complexation de nos invités par les peptides. Dans le cas des heptapeptides à deux éthers-couronne, cette complexation s'accompagne de profonds changements conformationnels et d'une rigidification des squelettes peptidiques. Nous avons relevé l'apparition de pics identifiés par Stoddart *et al.* comme caractéristiques des pseudorotaxanes formés entre DB24C8 et DA•2PF<sub>6</sub>; et ce, aussi bien dans l'acétonitrile que dans le chloroforme. Ce premier solvant nous a fourni la preuve de l'existence d'un équilibre en permettant de différencier les polyammoniums libres et complexés. Ceci n'est pas possible dans le chloroforme où, en raison de leur insolubilité, les invités présents sont forcément sous forme complexée.

La possibilité de différencier les acides aminés dans le cas des peptides **67** et **68** était espérée afin de pouvoir obtenir des informations par RMN quant à la conformation adoptée par ces peptides. Malheureusement, toutes nos expériences de NOE, à une ou deux dimensions, sont restées infructueuses jusqu'à aujourd'hui. Néanmoins, certaines interrogations peuvent être soulevées à propos des observations faites sur le complexe [**68**•DA]•2PF<sub>6</sub>: Pour quelle raison observe-t-on 4 signaux différents pour les éthers-couronne complexés ? Si l'on exclut la possibilité de complexes partiels, comme l'a suggéré la spectrométrie de masse, une explication pourrait être l'existence de deux atropisomères (Figure 71) produits lors de la formation des pseudorotaxanes. Le modèle proposé est basé sur la structure cristalline du complexe [(DB24C8)<sub>2</sub>•DA]•2PF<sub>6</sub> (Figure 57).



**Figure 71.** Deux atropisomères possibles d'un [2]pseudorotaxane peptidique

Le fait que les couronnes n'impliquent pas le même cycle aromatique dans l'empilement  $\pi-\pi$  devrait avoir une grande influence sur les déplacements chimiques des protons du carbone- $\alpha$  et des méthylènes benzyliques, conduisant à au moins 4 types de signaux pour ceux-ci. Cette hypothèse est supportée par l'identification de deux signaux attribués à des valines complexées dans le spectre du complexe  $[\underline{67}\cdot\text{DA}]\cdot 2\text{PF}_6$ .

Nous avons déduit de l'observation des spectres RMN des complexes l'existence de profonds changements conformationnels au coeur du peptide. Ceci pourrait être confirmé par des études de DC.

## CHAPITRE 3

### ÉTUDES CONFORMATIONNELLES PAR SPECTROPOLARIMÉTRIE DE DICHROÏSME CIRCULAIRE

#### 3.1 Préambule

La RMN nous ayant permis de mettre en évidence le phénomène de complexation, nous attendons des études par dichroïsme circulaire (DC), qu'elles révèlent des changements conformationnels importants dans nos peptides, suivant qu'ils sont en présence de l'invité ou libres. Étant donnée la fréquente utilisation des courbes de DC pour caractériser les conformations des peptides et des protéines en solution (*cf.* 2.2 de la première partie), l'utilisation de cet outil nous semble particulièrement adéquate dans le cours de notre projet.

En raison de leur forte absorbance dans les longueurs d'onde d'intérêt pour l'étude des peptides en DC, il s'avère impossible d'utiliser le chloroforme ou le DCM comme solvant. De plus, nos peptides sont insolubles dans les solvants très apolaires, comme le 1,2-dichloroéthane, et l'utilisation de solvants protiques est bien-sûr à proscrire. Notre choix s'est porté sur l'acétonitrile, qui n'absorbe fortement qu'à moins de 190 nm. Tous les peptides étant partiellement ou totalement solubles dans ce solvant, son choix devenait évident. Il est cependant à noter que les sels  $DA \cdot 2PF_6$  et  $TA \cdot 3PF_6$

sont eux-aussi relativement solubles dans l'acétonitrile. Ceci n'ira vraisemblablement pas sans influencer la stabilité des complexes et pourrait même fortement défavoriser la formation de ceux-ci. En effet, Stoddart *et al.* (80) rapportent des  $K_a$  jusqu'à 60 fois inférieurs, dans l'acétonitrile par rapport au chloroforme, pour des complexes entre DB24C8 et un sel d'ammonium analogue à  $DA \cdot 2PF_6$ .

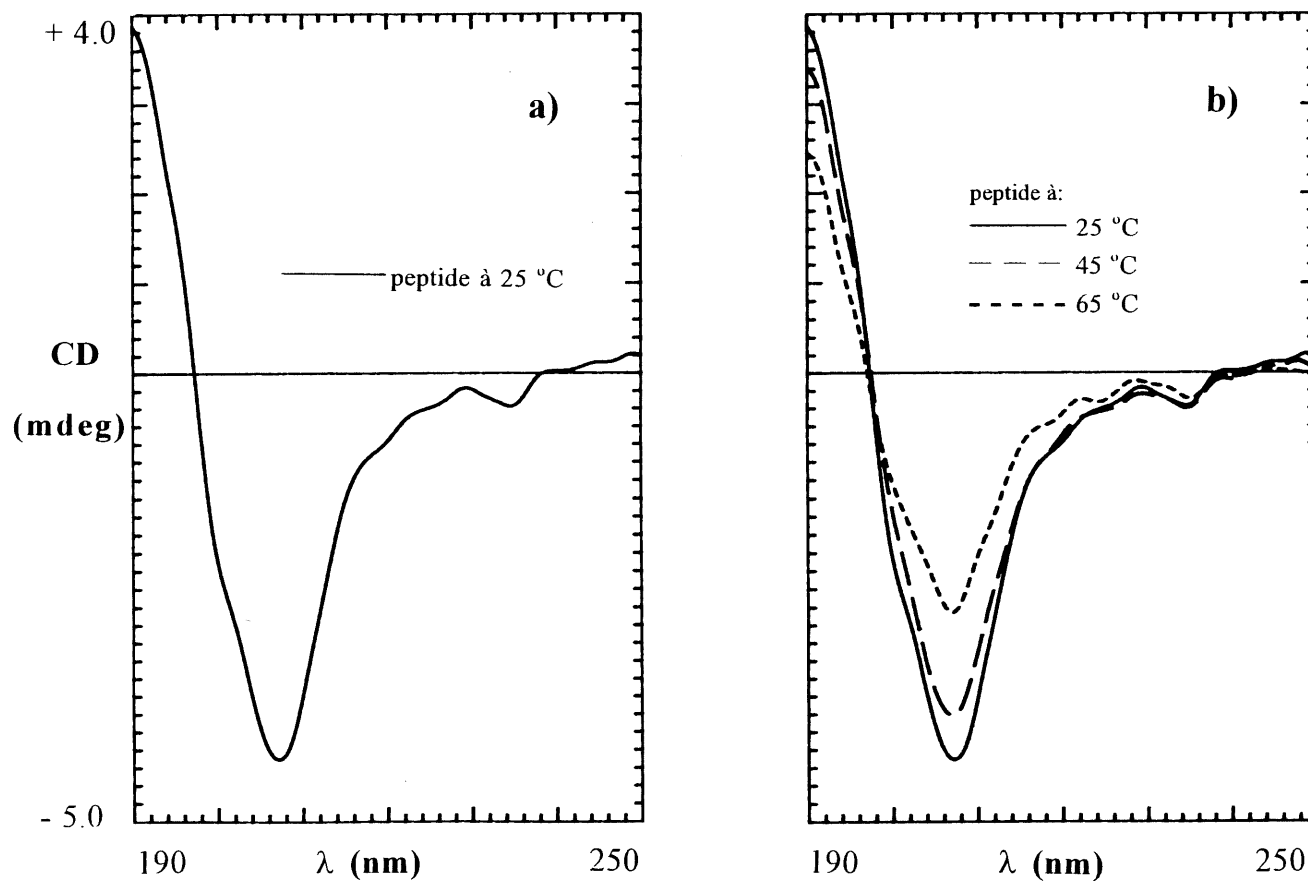
### 3.2 Études du peptide 63 et du complexe $[63 \cdot DA] \cdot 2PF_6$

#### 3.2.1 Étude du peptide 63

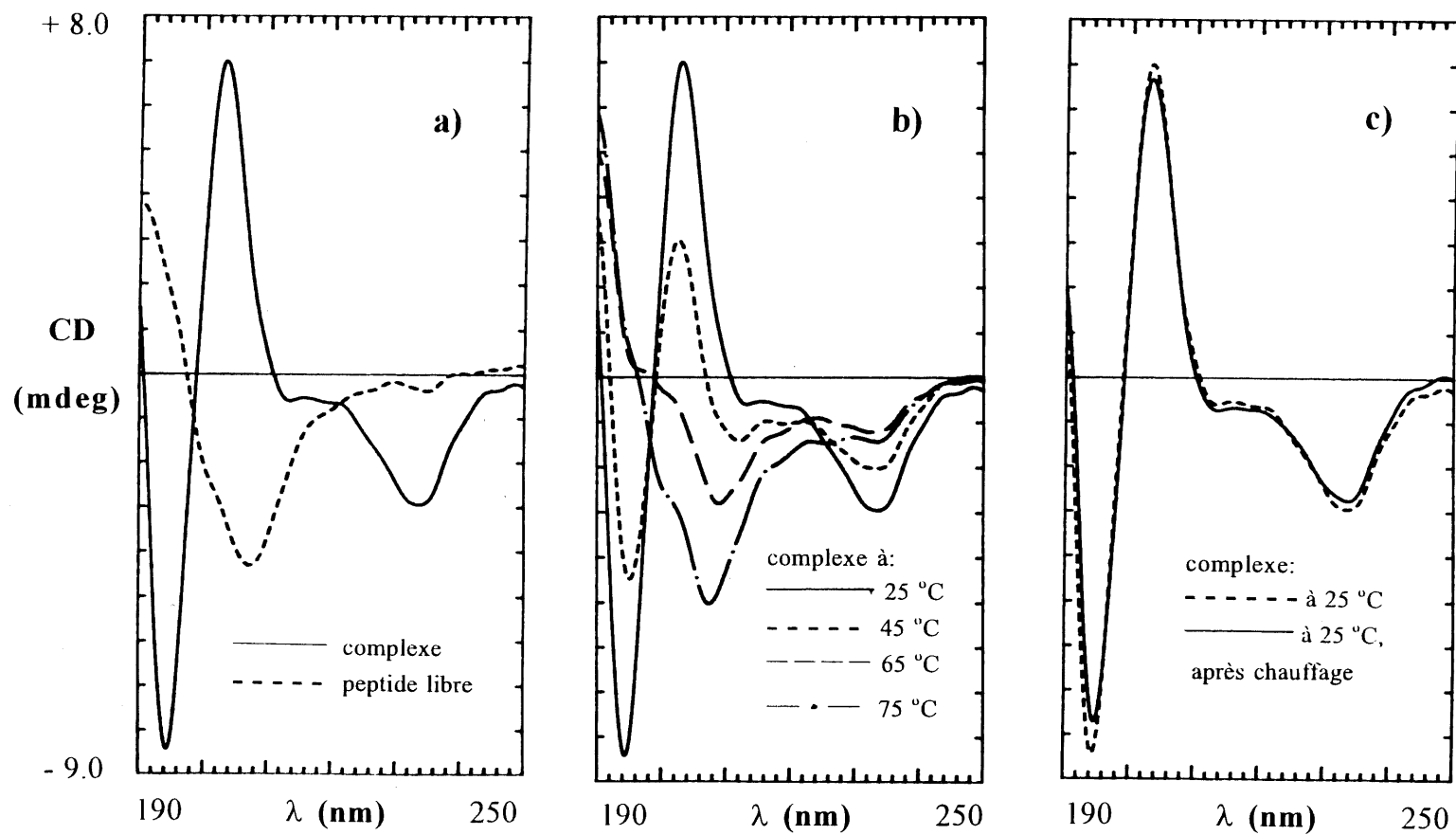
Même lors d'essais de préparation de solution à 1 mg/mL, le peptide 63 ne s'avère qu'incomplètement soluble dans l'acétonitrile. La concentration de la solution n'étant pas connue, nous ne rapporterons que des résultats qualitatifs pour ces études en DC (exprimés en millidegré).

La suspension de 63 dans l'acétonitrile est filtrée et analysée sur le spectropolarimètre. Les résultats des études sont rapportés sur la Figure 72a.

Bien que peu caractéristique d'une structure secondaire organisée bien définie, cette courbe semble indiquer un début d'arrangement en hélice  $\alpha$ , de par son analogie avec celles obtenues lors de la dénaturation de protéines riches en cette structure hélicoïdale (maximum à 190 nm et minimum à 207 nm) (47). L'étude à température variable (Figure 72b) produit un écrasement de la courbe, ce qui caractérise une désorganisation. Si notre peptide avait possédé une structure aléatoire, nous nous serions attendus à une intensification du minimum.



**Figure 72.** Étude conformationnelle du peptide 63 par DC



**Figure 73.** Étude conformationnelle du complexe  $[63 \cdot DA] \cdot 2PF_6$  par DC



En fait, les résultats obtenus semblent procéder de deux effets: 1) sa forte teneur en leucine tend à influencer l'organisation du peptide en hélice  $\alpha$  2) la taille limitée de celui-ci empêche l'obtention d'une hélice bien définie, ce qui se serait traduit par l'observation d'un deuxième minimum à 222-223 nm (46).

### 3.2.2 Étude du complexe $[63 \cdot \text{DA}] \cdot 2\text{PF}_6$

Si nous additionnons à la suspension préparée ci-dessus 1 équivalent de sel  $\text{DA} \cdot 2\text{PF}_6$  et mettons le mélange sous agitation pendant quelques heures, nous observons une solubilisation progressive du peptide et finissons par obtenir une solution limpide. Celle-ci est alors analysée sur le spectropolarimètre. Les résultats obtenus sont rapportés sur la Figure 73a.

Nous notons un changement spectaculaire dans l'allure de la courbe par comparaison avec celle du peptide libre. Celle-ci indique la formation d'une structure secondaire organisée sous l'effet de la complexation de l'invité. Avec deux minima à 194 et 234 nm et un maximum à 203 nm, elle est significative d'une organisation en tournant  $\beta$  (48). Néanmoins, la dépression dans la bande 210-220 nm, qui n'a pas lieu d'être selon les courbes théoriques de tournants  $\beta$ , est représentative d'un équilibre entre les formes complexée et libre du peptide. En effet, le signal DC n'offre qu'une vue d'ensemble macroscopique du mélange, contrairement à la RMN qui peut permettre l'identification de chaque espèce présente, pourvu que sa « durée de vie » soit suffisamment longue.

Ces premières conclusions sont corroborées par les études à température variable. A mesure que la température augmente, nous notons une

décomplexation progressive et un retour vers la conformation originale du peptide libre. A 75 °C, il n'existe pour ainsi dire plus d'espèce complexée (Figure 73b).

De façon très intéressante, si on laisse revenir à 25 °C la solution préalablement chauffée, nous enregistrons un spectre DC absolument superposable à celui initialement obtenu à cette température avec le complexe (Figure 73c). Ceci est significatif de la reconstitution du complexe et révélateur de sa stabilité, malgré les réarrangements conformationnels majeurs que sa formation impose au peptide 63. Même après plusieurs cycles de chauffage et refroidissement, le complexe reprend sa conformation originale et les courbes restent strictement superposables.

### 3.3 Études du peptide 64 et du complexe [64•DA]•2PF<sub>6</sub>

#### 3.3.1 Étude du peptide 64

Ce peptide s'avère très peu soluble dans l'acétonitrile et son étude en DC sera donc également simplement qualitative.

Le type de courbe obtenu dans ce cas est très similaire à celui du peptide 63 (Figure 74a). Le peu de peptide dissous ne nous permet pas d'obtenir un signal de très bonne qualité. Nous notons cependant qu'il semblerait indiquer un degré d'organisation en hélice  $\alpha$  plus avancé, de par la légère inflexion de la courbe vers 220 nm. Ceci peut s'expliquer par la taille légèrement supérieure de 64, conséquence de la présence d'un résidu leucine supplémentaire.

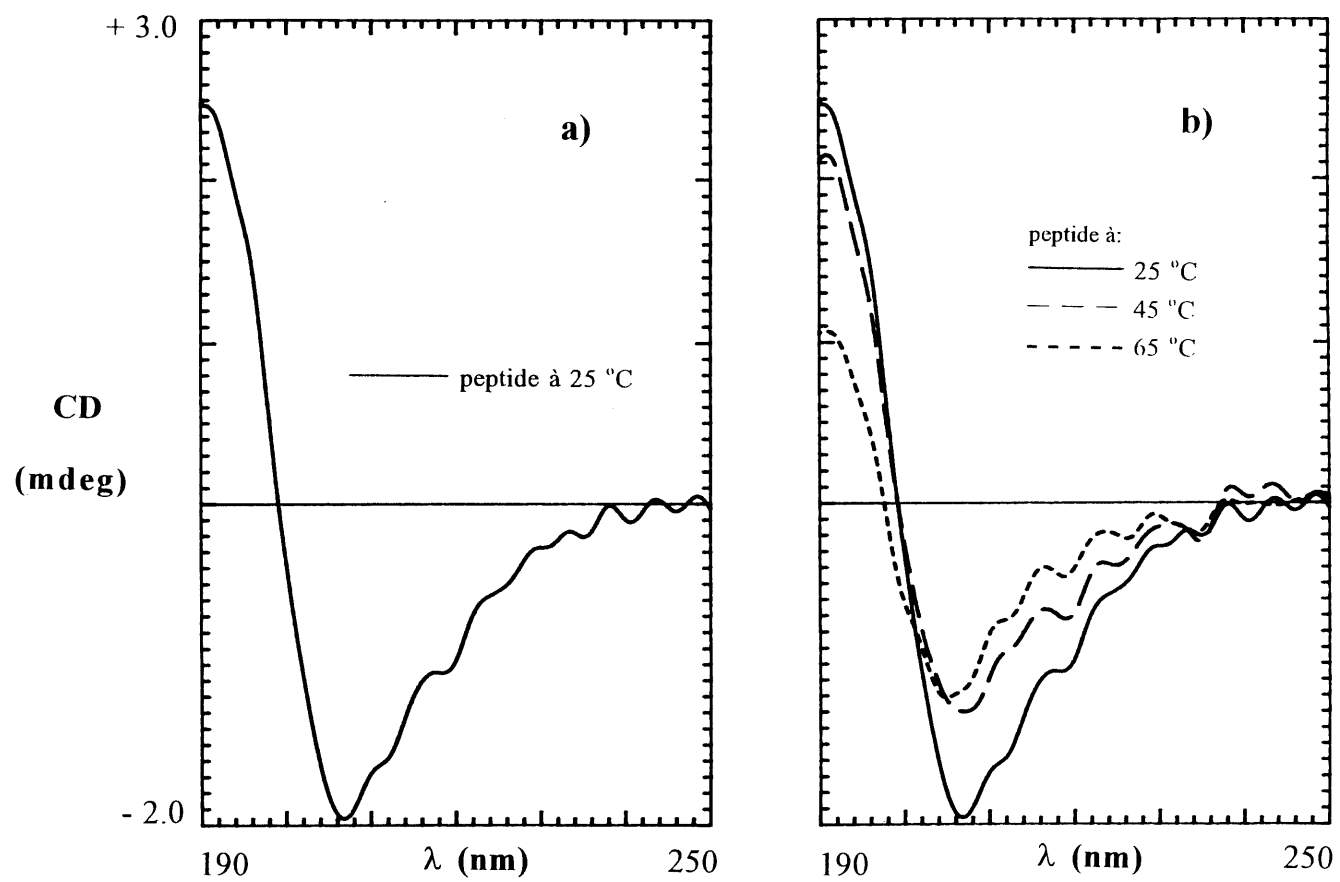
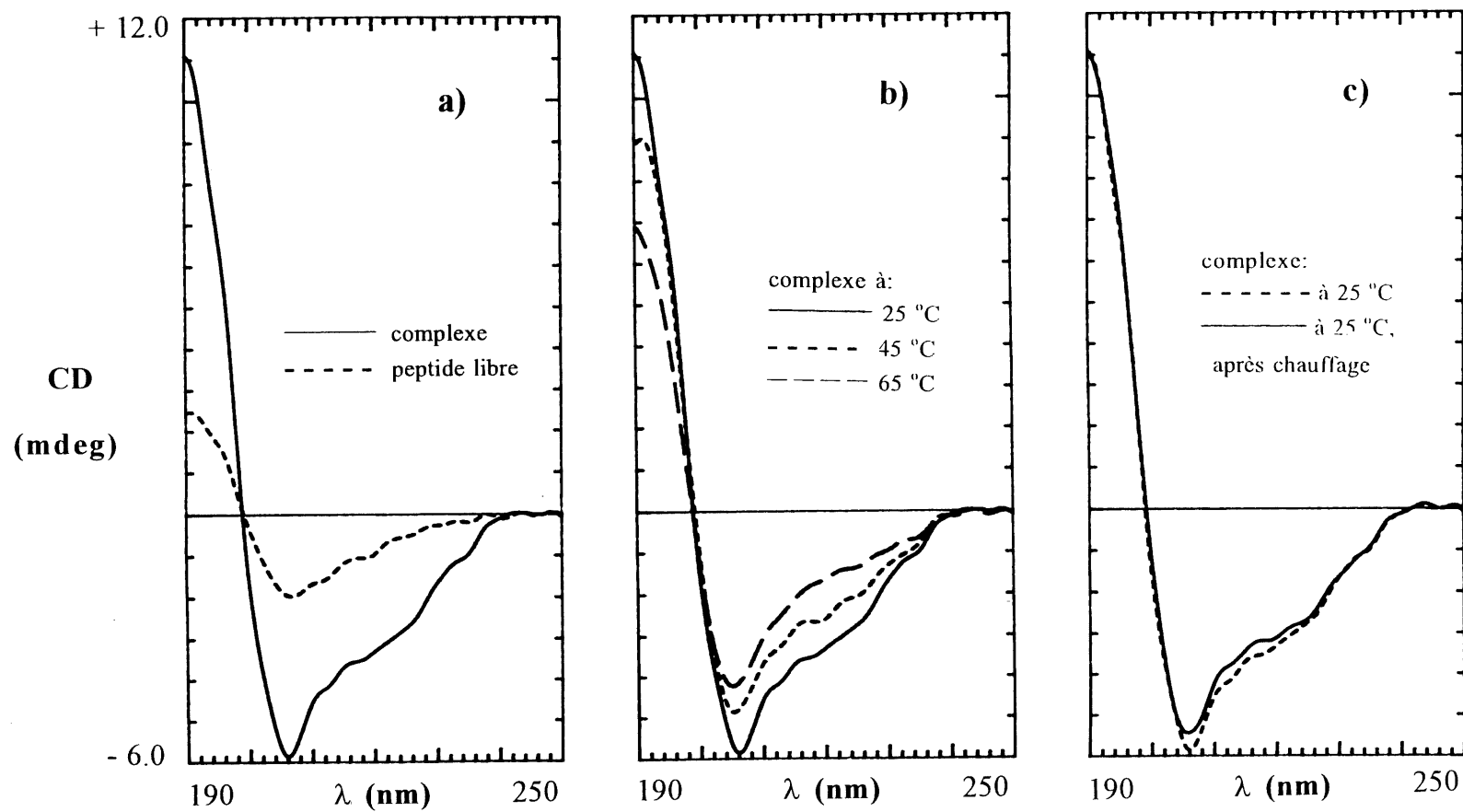


Figure 74. Étude conformationnelle du peptide 64 par DC



**Figure 75.** Étude conformationnelle du complexe  $[64\bullet DA]\bullet 2PF_6$  par DC

A mesure que la température augmente, le peptide **64** perd son organisation, comme le révèle l'aplatissement des courbes de DC (Figure 74b).

### 3.3.2 Étude du complexe [**64**•DA]•2PF<sub>6</sub>

L'adjonction d'un équivalent de DA•2PF<sub>6</sub> à la suspension de **64** dans l'acétonitrile ne conduit pas à une dissolution complète du peptide dans ce cas. Après filtration, nous obtenons la courbe DC reproduite dans la Figure 75a.

Un changement notable s'est produit par rapport aux courbes obtenues avec le peptide libre, au moins de par l'intensification des minimum et maximum. Mais l'allure générale de la courbe reste la même. Ceci peut être interprété de deux façons: 1) l'adjonction du sel d'ammoniums permet une plus grande solubilisation du peptide et de là, une intensification du signal DC 2) la formation du complexe ne nécessite pas de réorganisation drastique du squelette peptidique, d'où la conservation d'une allure de courbe similaire.

L'étude à température variable (Figure 75b) permet d'écarter la proposition 1). En effet, à mesure que la température augmente, nous notons que l'allure générale des courbes se rapproche de celles du peptide libre. Ceci est révélateur d'un phénomène de décomplexation. Au contraire, un simple effet de solubilisation aurait provoqué une intensification des signaux à plus haute température.

Dans ce cas encore, un abaissement de la température à 25 °C permet de reformer le complexe original (Figure 75c).

Le peptide **64** a donc un comportement similaire à celui de son homologue **63**. Mais leur différence réside essentiellement dans le fait que le

premier semble globalement *préorganisé* pour la complexation de  $\text{DA} \cdot 2\text{PF}_6$ , alors que le dernier serait quant à lui *prédisposé* (99). Ces conclusions sont appuyées par les études en RMN  $^1\text{H}$  qui révélaient une réorganisation mineure de **64** lors de la formation du complexe, contrairement à **63** qui semblait subir de profondes modifications conformationnelles.

### 3.4 Études des composés **65**, **66**, $[\text{65} \cdot \text{TA}] \cdot 3\text{PF}_6$ et $[\text{66} \cdot \text{TA}] \cdot 3\text{PF}_6$

#### 3.4.1 Étude des peptides **65** et **66**

Les résultats obtenus avec ces deux peptides sont très similaires et ont donc été rapportés conjointement.

Les deux composés sont très solubles dans l'acétonitrile et présentent des courbes de DC possédant des minima à 208 et 221 nm, ainsi qu'un maximum à 191 nm; ceci indique qu'ils sont majoritairement organisés en hélice  $\alpha$  (46) (Figures 76a et 77a). Le peptide **66** doit son caractère hélicoïdal plus prononcé, caractérisé par des valeurs d'ellipticité plus importantes à 221 nm, à sa plus grande taille.

Si l'on chauffe les solutions, on assiste à une progressive désorganisation des structures, comme il était attendu (Figures 76b et 77b).

#### 3.4.2 Étude des complexes $[\text{65} \cdot \text{TA}] \cdot 3\text{PF}_6$ et $[\text{66} \cdot \text{TA}] \cdot 3\text{PF}_6$

L'ajout d'un équivalent de sel  $\text{TA} \cdot 3\text{PF}_6$  ne produit pas de changements structuraux spectaculaires (Figures 78a et 79a).

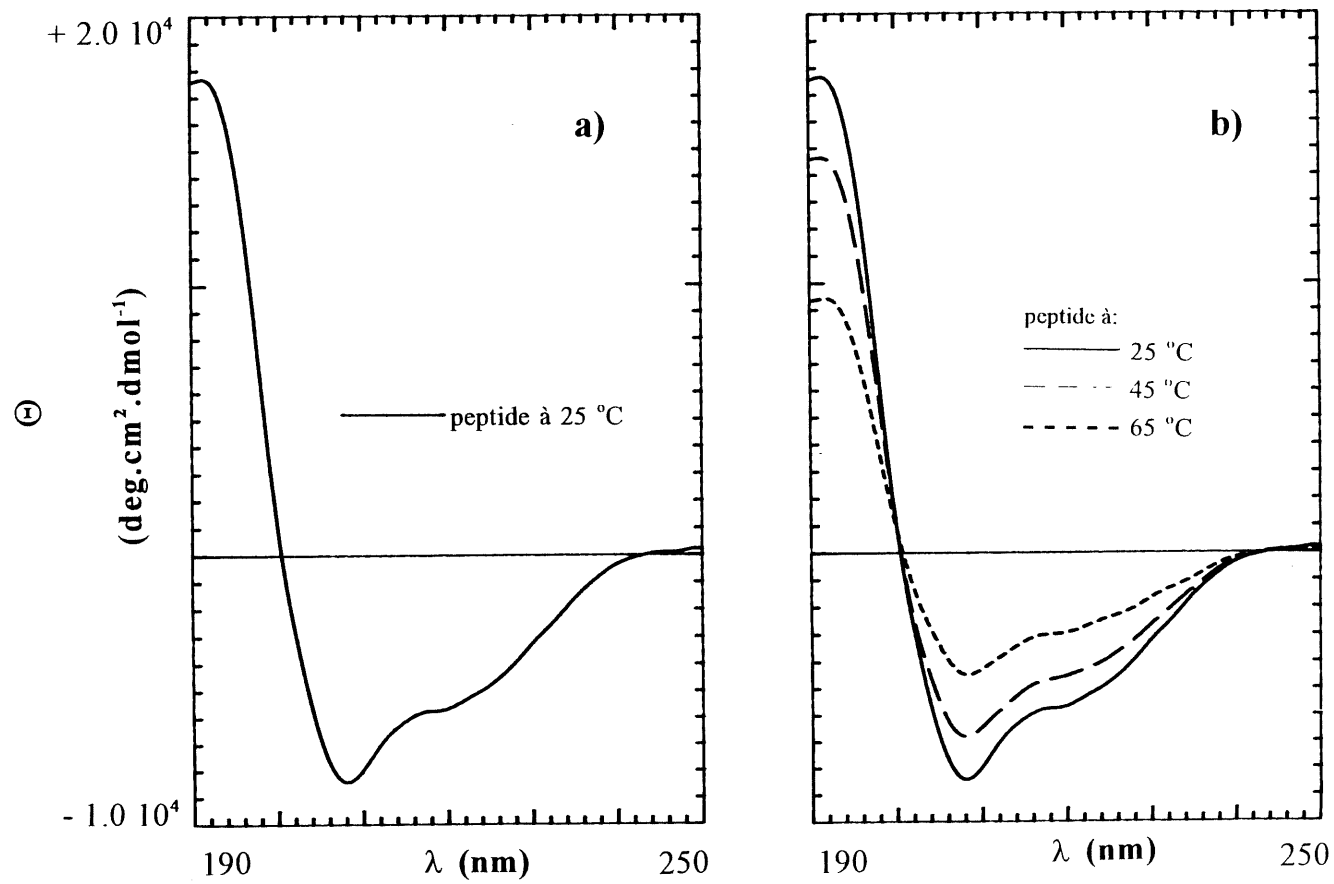
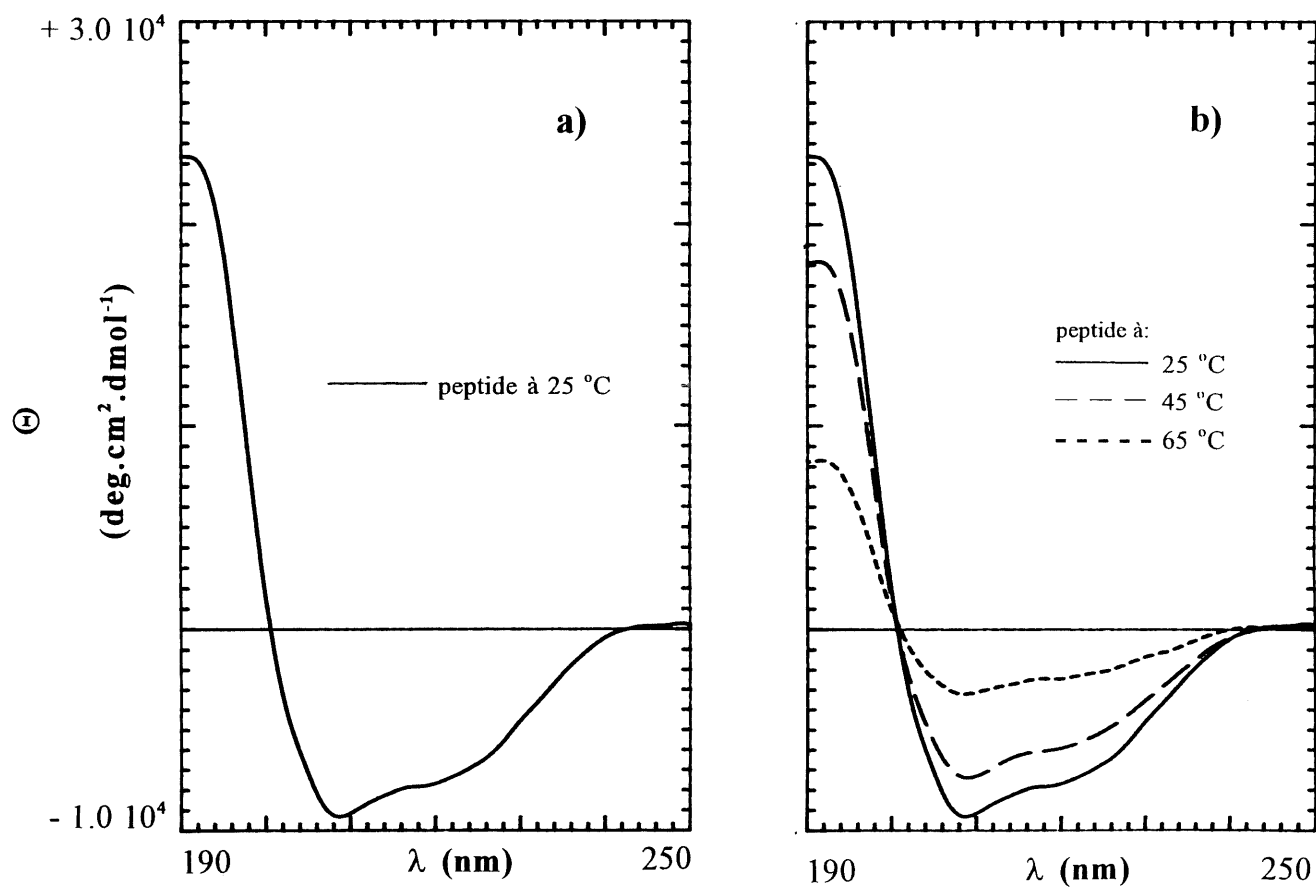
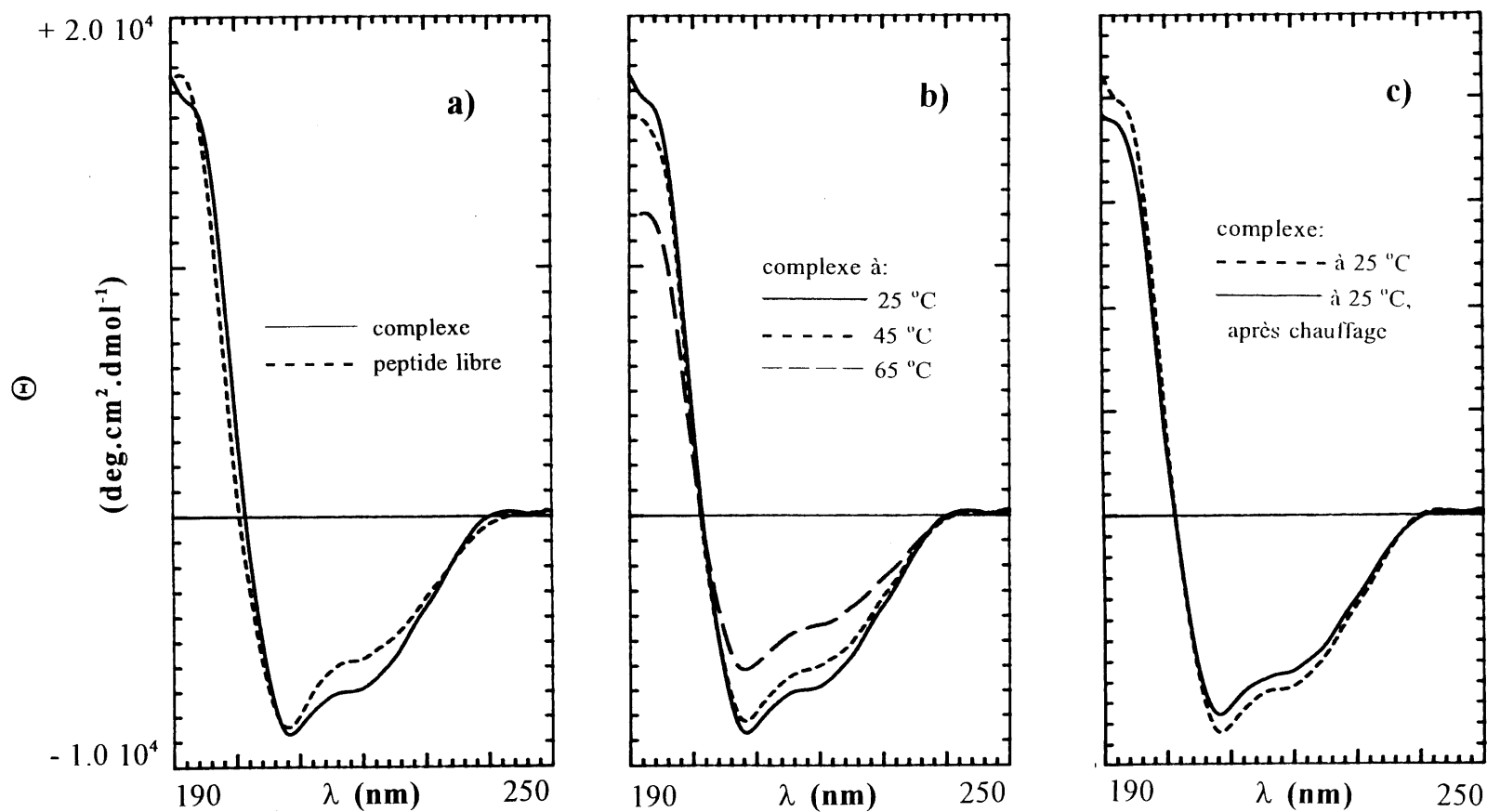


Figure 76. Étude conformationnelle du peptide 65 par DC



**Figure 77.** Étude conformationnelle du peptide **66** par DC





**Figure 78.** Étude conformationnelle du complexe  $[65\cdot TA]\cdot 3PF_6$  par DC

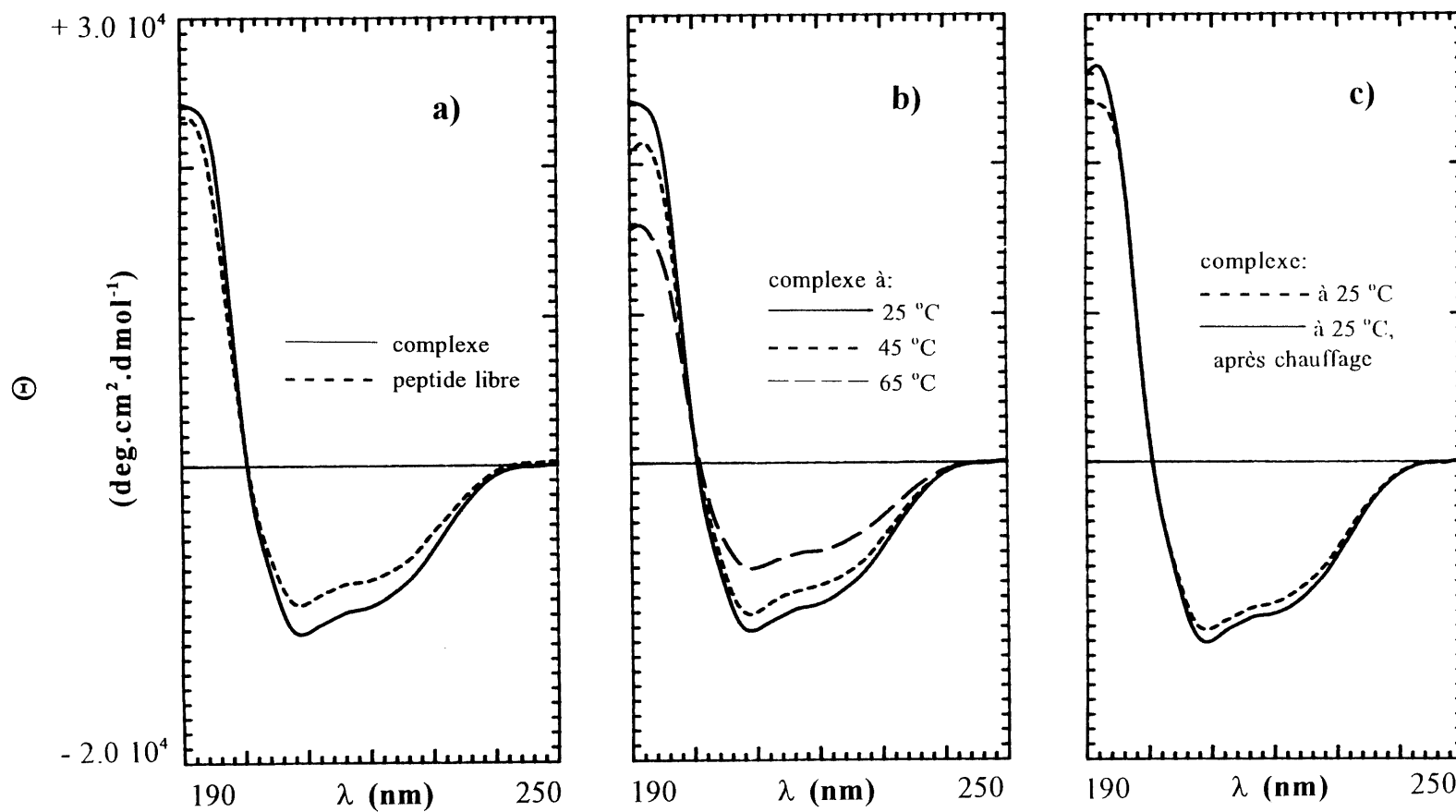
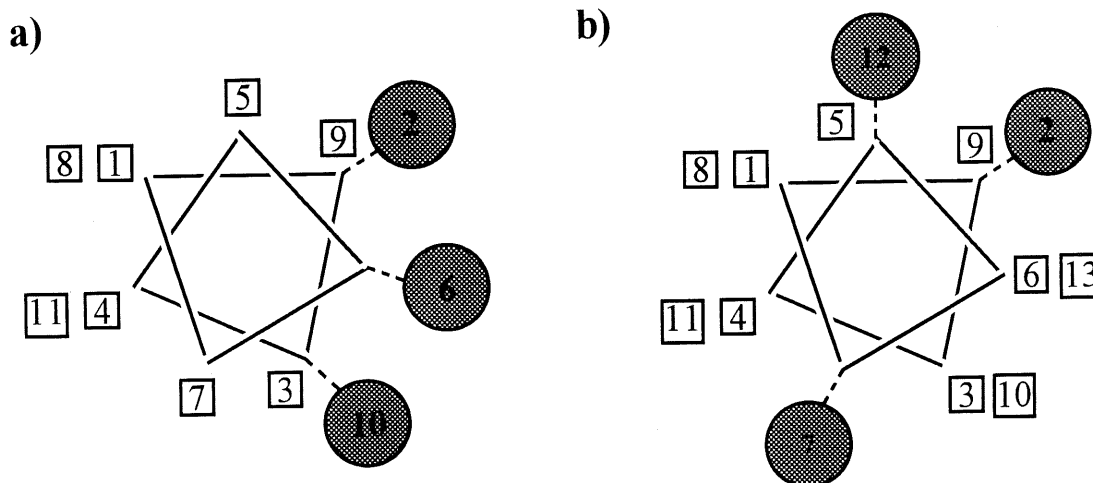


Figure 79. Étude conformationnelle du complexe  $[6.6.TA] \cdot 3PF_6$  par DC

Néanmoins, dans le cas de  $[65 \cdot TA] \cdot 3PF_6$ , on peut observer une légère augmentation d'intensité du minimum à 221 nm, par rapport à la courbe du peptide libre. Ceci est révélateur d'une accentuation du caractère hélicoïdal du peptide (47). Nous noterons qu'en conformation d'hélice  $\alpha$ , **65** a ses trois éthers-couronne globalement alignés, ce qui n'est pas le cas de **66** (Figure 80).

Ces résultats pourraient être un indice d'une complexation du triammonium impliquant les trois éthers-couronne dans le cas de **65**, le bloquant en conformation d'hélice  $\alpha$ .

Si cette préférence conformationnelle est également vraie pour **66**, nous ne pourrions avoir qu'une complexation partielle de l'invité par seulement deux éthers-couronne. Celle-ci pourrait également conduire à un blocage de la conformation hélicoïdale.



**Figure 80.** Schéma représentant la conformation d'hélice  $\alpha$  pour a) le peptide **65** b) le peptide **66**

Dans ces deux cas également, le complexe se défait sous l'action de la chaleur (Figures 78b et 79b), puis se reforme spontanément une fois la solution ramenée à 25 °C (Figures 78c et 79c).

### 3.5 Études du peptide 67 et du complexe [67•DA]•2PF<sub>6</sub>

Le peptide 67 présente une solubilité dans l'acétonitrile supérieure à celle des deux précédents. De ce fait, nous pouvons exprimer les signaux de DC en *ellipticité molaire moyenne par résidu* ( $\Theta$ , degré.centimètre-carré par décimole), c'est à dire, en éliminant le facteur concentration: ceci fait que les valeurs données sont intrinsèques au peptide.

La courbe DC du peptide 67 libre (Figure 81a) présente un minimum à 211 nm. Ceci est peu compatible avec une structure d'hélice  $\alpha$ , mais plutôt indicatif d'une composante de feuillet  $\beta$  antiparallèle (50). Pour le reste, nous notons que lors de la formation du complexe ou lors des expériences à température variable, son comportement est très similaire à celui du peptide 63 (Figure 81b et 82). Ceci est logique vu que pour ces deux peptides, la distance entre les éthers-couronne est la même et qu'aucun des deux n'est préorganisé pour la complexation.

Nous pouvons donc en déduire que si la nature du squelette peptidique semble avoir une légère influence sur la conformation adoptée par le peptide libre, cela ne semble pas être le cas une fois le complexe formé. Cet élément pourrait être un indice de la possibilité d'induire un contrôle conformationnel précis sur divers peptides de même taille, mais de nature assez différente.

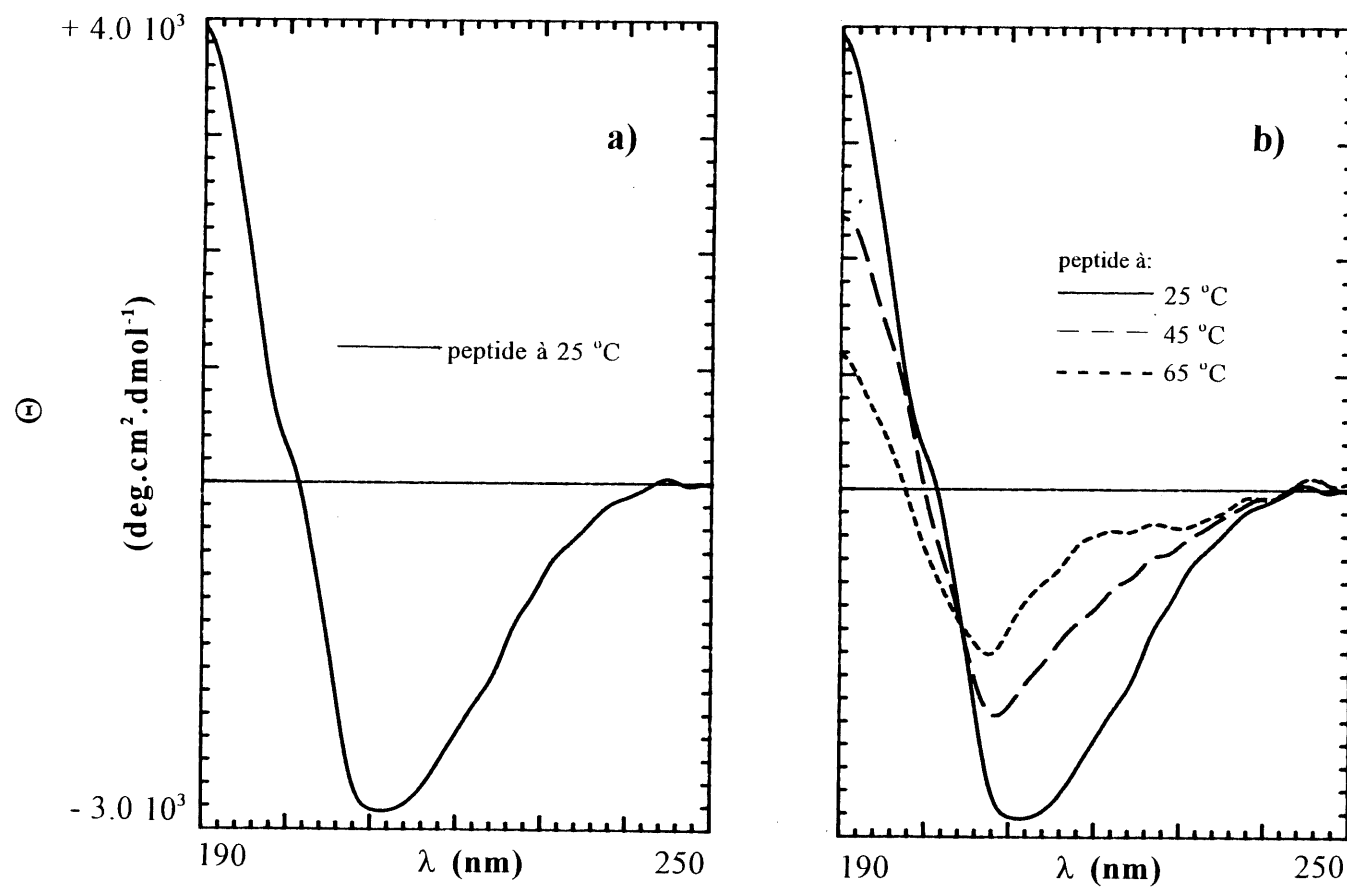
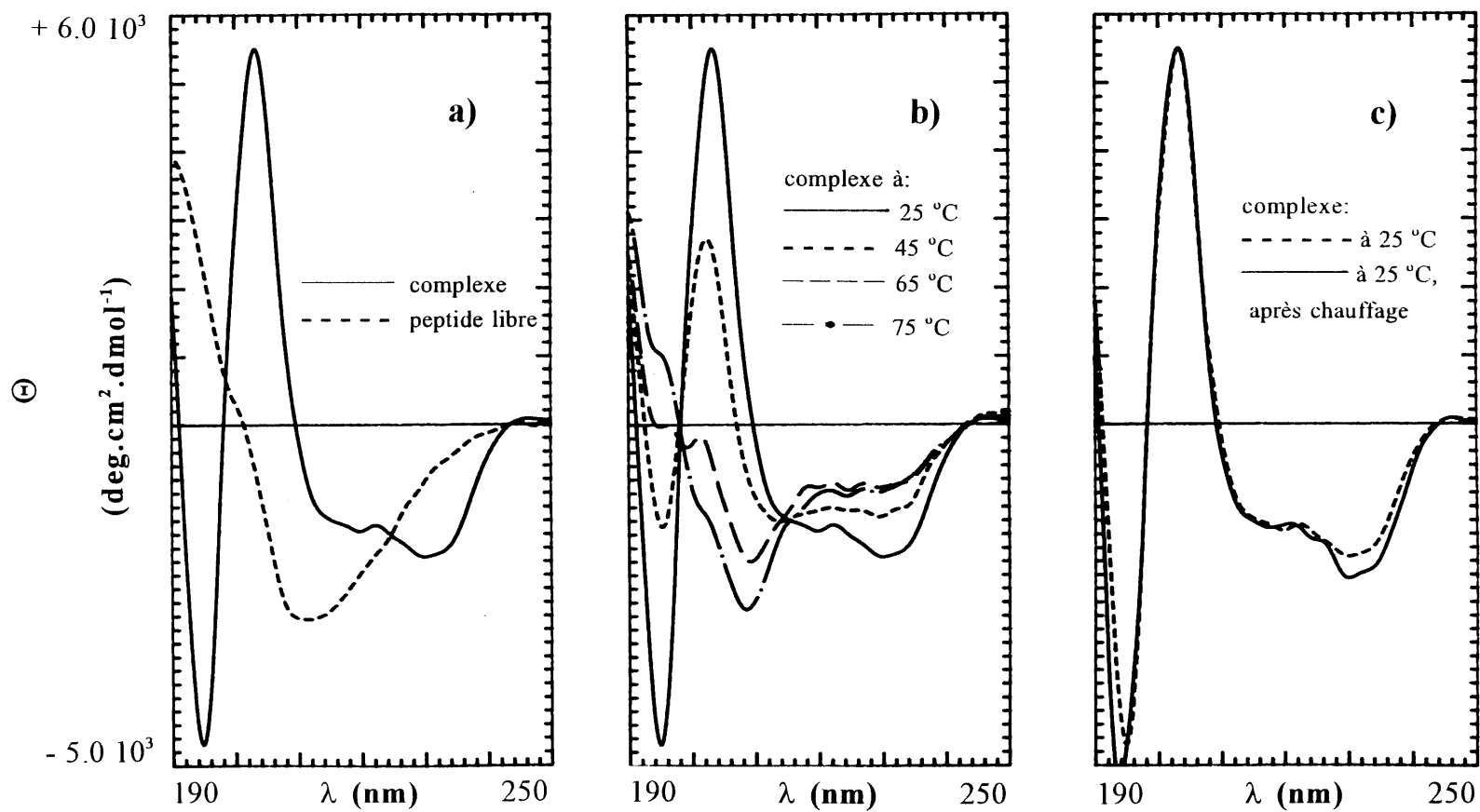


Figure 81. Étude conformationnelle du peptide 67 par DC



**Figure 82.** Étude conformationnelle du complexe  $[67 \cdot DA] \cdot 2PF_6$  par DC

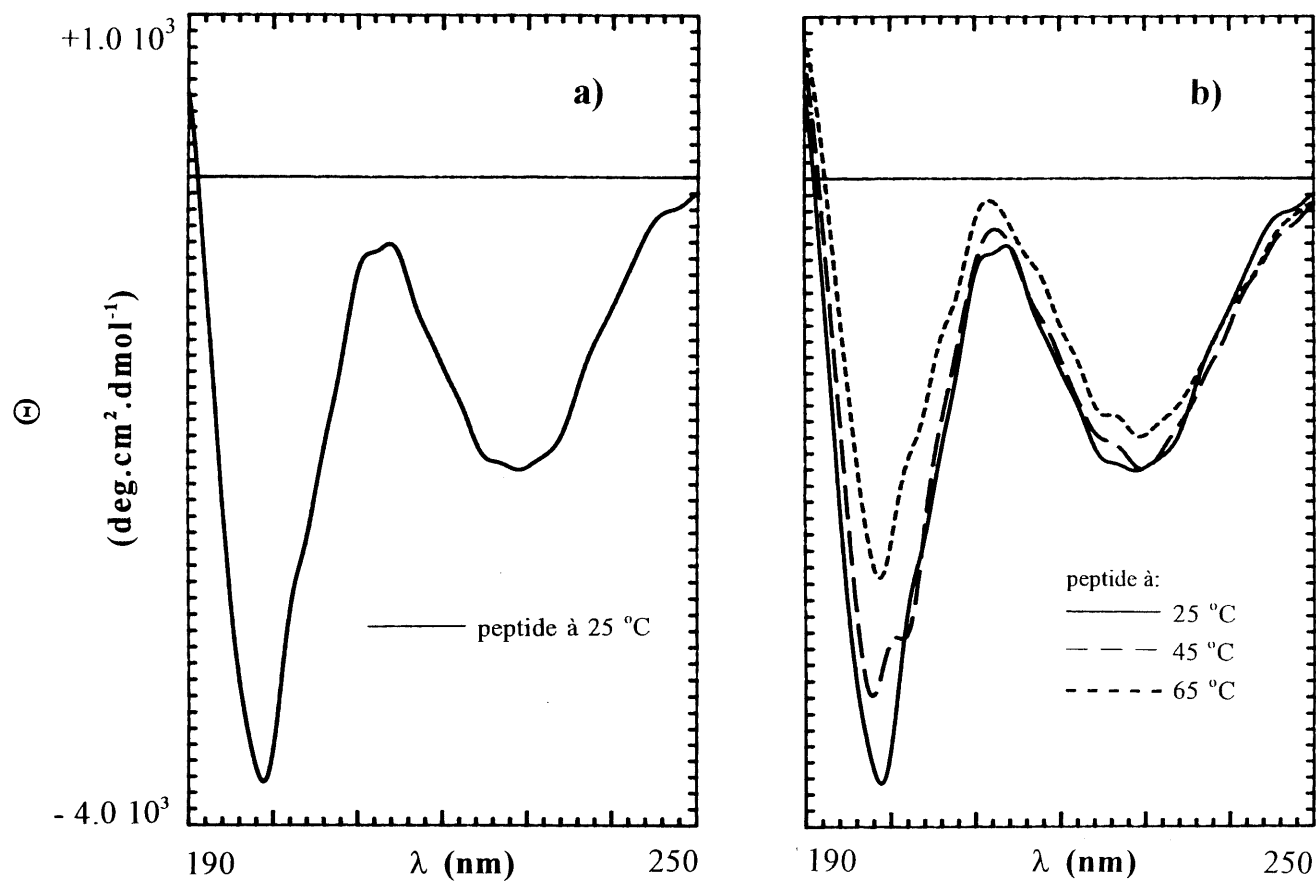
### 3.6 Études du peptide 68 et du complexe [68•DA]•2PF<sub>6</sub>

#### 3.6.1 Étude du peptide 68

Ce peptide est très soluble dans l'acétonitrile. Son étude en spectropolarimétrie DC conduit aux courbes de la Figure 83.

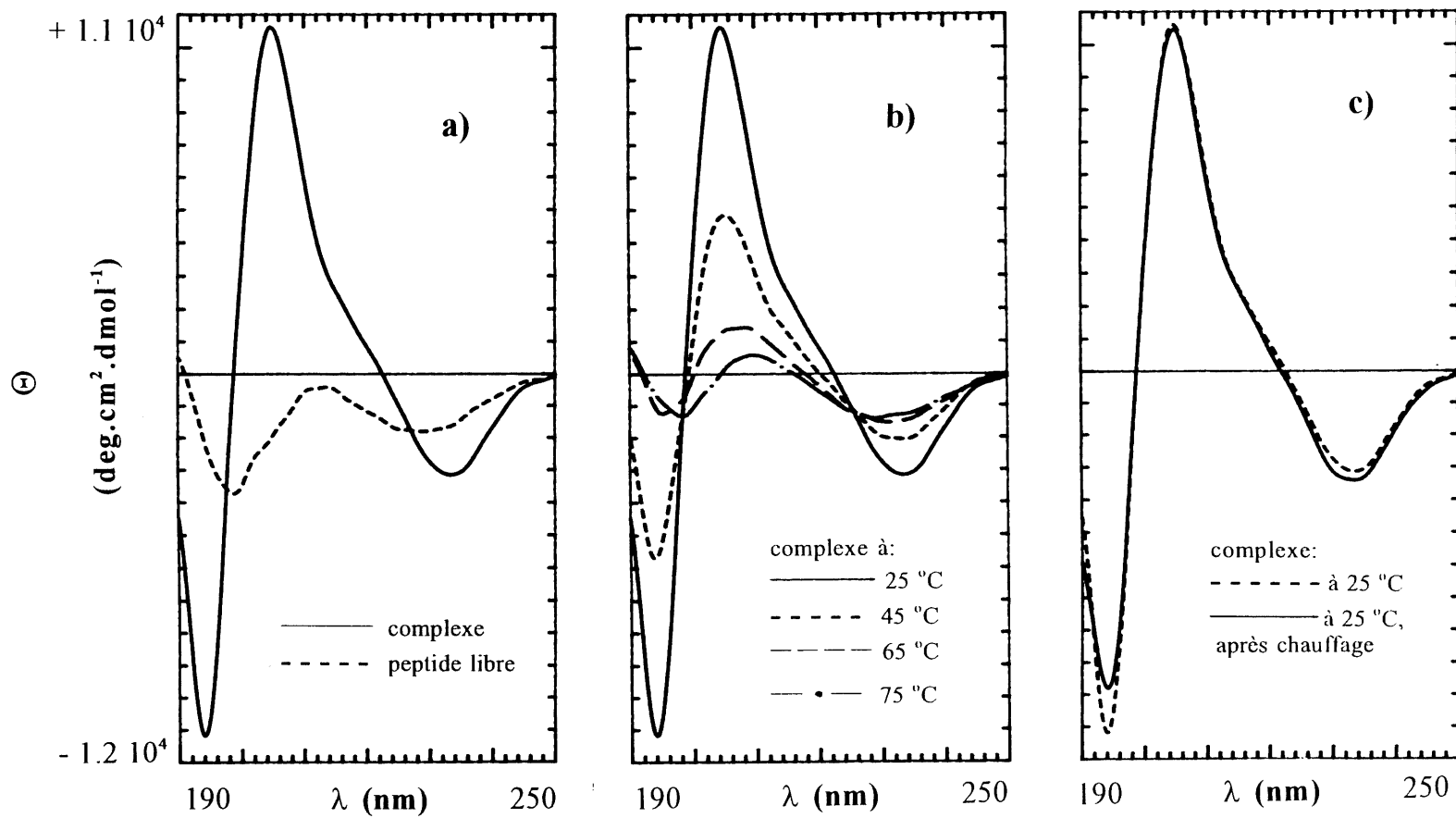
La conformation adoptée par le peptide libre semble nettement différente de celle des trois précédents. Les deux minima à 199 et 229 nm, assortis d'aucun signal DC positif dans la gamme de longueurs d'onde étudiée, le différencient nettement de ses homologues. La présence d'un résidu proline au centre du peptide devrait avoir comme influence d'orienter celui-ci vers une conformation de tournant  $\beta$  (46). Pourtant le type de courbe obtenu est parfois associé à la structure désorganisée de certaines protéines, comme la papaïne (49). Lorsqu'on observe la conformation adoptée par son homologue 67 (Figure 81a), qui diffère seulement par un acide aminé, on constate que ce type de peptide aurait plutôt tendance à s'orienter vers une structure en feuillet  $\beta$ . Nous pouvons en déduire que la seule proline empêche le peptide 68 d'adopter cette conformation, et le contraint à s'organiser de façon intermédiaire entre un tournant  $\beta$  non favorisé et une structure aléatoire.

Lors de l'étude à température variable (Figure 83b), nous notons une diminution d'intensité du minimum à 199 nm. Or, c'est une augmentation qui serait attendue si la conformation du peptide voyait s'accroître son caractère aléatoire. Nous pouvons en conclure que le peptide 68 adopte, à 25 °C, une structure organisée particulière et atypique.



**Figure 83.** Étude conformationnelle du peptide **68** par DC





**Figure 84.** Étude conformationnelle du complexe  $[68 \cdot DA] \cdot 2PF_6$  par DC

### 3.6.2 Étude du complexe [68•DA]•2PF<sub>6</sub>

Après ajout d'un équivalent de DA•2PF<sub>6</sub>, nous reprenons les études DC. A 25 °C, le complexe conduit à la courbe reproduite à la Figure 84a. C'est encore une fois une courbe caractéristique d'un tournant  $\beta$ . Mais, contrairement à celles obtenues avec les peptides 63 et 67, celle-ci n'est pas altérée par la dépression dans la gamme de longueurs d'onde comprise entre 210 et 220 nm. La présence de la proline facilite peut-être l'adoption de cette conformation nécessaire à nos peptides de 7 acides aminés pour former le complexe. Malgré tout, il semble se confirmer que la nature du peptide, n'influence pas la structure du complexe, puisque trois peptides qui adoptent des conformations différentes en solution conduisent à des complexes organisés de façon très similaire.

Lorsque l'on chauffe (Figure 84b), la superposition des courbes de DC à différentes températures présente deux points isosbestiques bien définis situés à 198 et 226 nm. Ceci caractérise la présence de seulement deux espèces en équilibre dans la solution: une correspondant au complexe [68•DA]•2PF<sub>6</sub>, l'autre au peptide libre. Autrement dit, nous obtenons là la preuve de l'organisation rigoureuse à la fois du peptide complexé, mais également du peptide libre.

Le résidu proline semble conférer une rigidité accrue au peptide 68, en comparaison de ses homologues 63 et 67, et semble le contraindre à une sorte de « tout ou rien » en présence de l'invité: une forme complexée organisée ou une forme libre également organisée.

Encore une fois, si l'on refroidit à 25 °C la solution de complexe préalablement chauffée à 75 °C (Figure 84c), nous obtenons une courbe strictement superposable à la courbe initiale à 25 °C. Ceci atteste de la re-formation spontanée et très rapide du complexe.

Nous résumons dans le Tableau 10 les interprétations tirées des données obtenues par DC. Celles-ci sont accompagnées des précautions d'usage à l'endroit du DC qui reste une technique donnant des informations d'un point de vue macroscopique, donc pas totalement irréfutables.

**Tableau 10.** Structures secondaires des peptides et des complexes estimées d'après les études de dichroïsme circulaire

Composé étudié	Minima (nm)	Maxima (nm)	Structure secondaire
<u>63</u>	207	190	partiellement hélicoïdale
[ <u>63</u> •DA]•2PF <sub>6</sub>	194 et 234	203	tournant β
<u>64</u>	207	190	partiellement hélicoïdale
[ <u>64</u> •DA]•2PF <sub>6</sub>	207	190	pseudo hélice α
<u>65</u>	208 et 221	191	hélice α
[ <u>65</u> •TA]•3PF <sub>6</sub>	208 et 221	190	hélice α
<u>66</u>	208 et 221	191	hélice α
[ <u>66</u> •TA]•3PF <sub>6</sub>	209 et 221	191	hélice α

Composé étudié	Minima (nm)	Maxima (nm)	Structure secondaire
<u>67</u>	211	190	feuillet $\beta$ partiel
[ <u>67</u> •DA]•2PF <sub>6</sub>	195 et 230	203	tournant $\beta$
<u>68</u>	199 et 229	214	tournant partiel
[ <u>68</u> •DA]•2PF <sub>6</sub>	194 et 233	205	tournant $\beta$

### 3.7 Conclusion

Les résultats obtenus lors des études de DC sont riches en informations. Les 4 peptides à deux éthers-couronne, quelle que soit l'organisation du peptide libre, forment des complexes en présence du sel DA•2PF<sub>6</sub>. Parmi ces peptides, nous pouvons distinguer les trois heptamères 63, 67 et 68 qui subissent une profonde réorganisation lors de la formation du complexe. Celle-ci les conduit vers une structure similaire de tournant  $\beta$ . Au contraire, l'octamère 64, *préorganisé* pour la complexation en structure hélicoïdale, ne présente pas de signe de changement conformationnel majeur lorsque mis en présence du sel d'ammoniums. Dans tous les cas, la forme complexée semble adopter une conformation précise. La complexité des spectres RMN observée en 2.3 serait plus probablement due à un mélange de différentes espèces chimiques (peptide libre + atropisomères du complexe) qu'à un équilibre conformationnel.

Le fait que la structure de tournant  $\beta$  soit imposée aux heptapeptides 63, 67 et 68 est indicatif de la stabilisation que produit la complexation, puisque

ceux-ci adoptent d'autres conformations sous forme libre. Le phénomène de complexation parvient à compenser le coût énergétique lié à la réorganisation et à la rigidification du squelette peptidique. Cette complexation se produit spontanément à 25 °C, quelle que soit la température initiale de la solution, indiquant que les complexes sont formés sous un contrôle thermodynamique. Stoddart *et al.* (100) rapportent que ceci est la règle générale dans le cas de la formation de pseudorotaxanes. De plus, la modification conformationnelle constitue la preuve irréfutable d'une complexation impliquant les deux éthers-couronne.

Il est plus difficile de tirer des conclusions dans le cas des peptides à trois éthers-couronne. **65** présente une organisation préférentielle en hélice  $\alpha$  qui lui permet d'aligner les éthers-couronne dans l'espace. Ceci rend possible la triple complexation du sel  $\text{TA} \cdot 3\text{PF}_6$ . Et nous observons effectivement une augmentation, quoique légère, du caractère hélicoïdal du peptide en présence de l'invité. Mais des complexes se forment également dans le cas de **66** (*cf.* 2.2) bien que sous sa conformation préférentielle d'hélice  $\alpha$ , il apparaisse impossible au peptide d'impliquer ses trois couronnes dans le processus de complexation (Figure 80). Il reste encore des points à éclaircir dans ces deux derniers cas.

Néanmoins, nous noterons que les résultats de DC semblent appuyer ceux obtenus en RMN. En effet, les peptides qui présentent en DC les plus importantes réorganisations structurales étaient également ceux qui subissaient les modifications spectrales les plus spectaculaires en RMN.

## CHAPITRE 4

### MESURE DES CONSTANTES D'ASSOCIATION

#### 4.1 Préambule

La formation d'un complexe dans des conditions d'équilibre implique l'existence d'une constante d'association, notée  $K_a$  (Équation 3), que nous nous proposons de mesurer. Notre but n'est pas tant de connaître la valeur en elle-même, que de la comparer à d'autres.



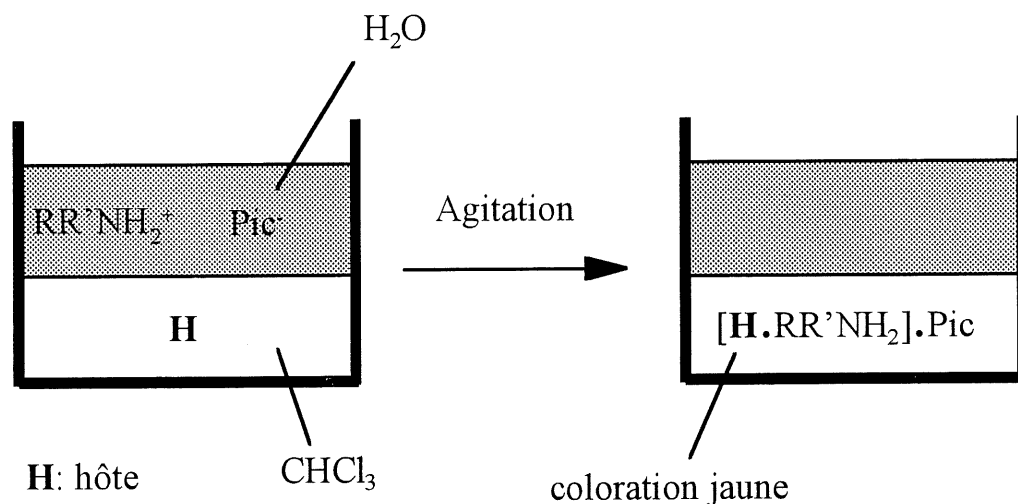
Au vu des résultats détaillés dans les chapitres précédents, nous avons décidé de limiter ces études aux 4 peptides à deux couronnes 63, 64, 67 et 68. Nous pouvons résumer nos objectifs de la façon suivante. 1) Un de ces peptides s'avère-t-il un bien meilleur hôte que les autres ? 2) Aura-t-il une préférence pour un diammonium secondaire polybenzylique par rapport à un homologue primaire aliphatique ? 3) En bénéficiant d'un effet de coopérativité, les constantes d'association mesurées seront-elles bien supérieures à celles obtenues avec DB24C8 « libre » par le groupe de Stoddart ?

Ces derniers utilisaient la RMN pour déterminer leurs  $K_a$ . Ceci est impossible dans notre cas, vue la complexité des spectres.

Voici comment nous avons tâché de répondre à ces interrogations.

## 4.2 Mesure des constantes d'association par la méthode d'extraction des picrates

### 4.2.1 Description de la méthode

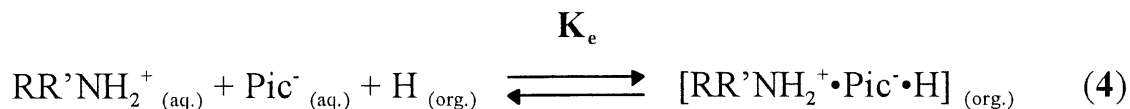


**Figure 85.** Représentation schématique de la méthode d'extraction des picrates

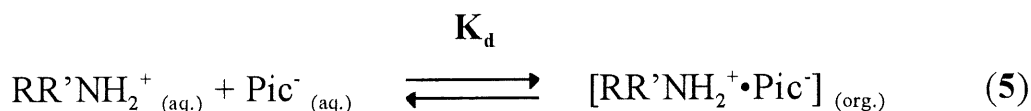
La méthode de mesure des  $K_a$  par extraction des picrates a été décrite par Pedersen (101), puis subséquemment améliorée par Cram (102).

Elle consiste à agiter un mélange biphasique constitué par une solution aqueuse de picrate d'ammonium et par une solution de l'hôte **H** dans un solvant halogéné (Figure 85). À l'équilibre, nous pouvons déterminer la

constante d'extraction ( $K_e$ ) par simple dosage de la concentration d'ions picrate dans la phase organique (Équation 4).



En l'absence de l'hôte, très peu de sel picrate diffuse dans la phase organique. Ce processus de diffusion est exprimé par la constante de distribution ( $K_d$ ) (Équation 5).



En présence de l'hôte, celui-ci complexe les ammoniums et entraîne par là même les contre-ions picrate dans la phase organique. Une simple lecture d'absorbance permet de déterminer la concentration de ceux-ci dans la phase organique, à l'équilibre. On peut ainsi en déduire les valeurs de  $K_e$  et  $K_d$ .

#### 4.2.2 Calcul des constantes d'association

En théorie, la valeur de  $K_a$  est calculée par le rapport:  $K_a = K_e/K_d$ . Mais en pratique, la constante d'association est estimée à partir des Équations 6 et 7.

$$K_a = \frac{R^*}{K_d \cdot (1-R^*) \cdot \{[RR'NH_2^+]_{(aq.)} - R^* \cdot [H]_{(org.)} \cdot (V_{(org.)}/V_{(aq.)})\}^2} \quad (6)$$



avec 
$$R^* = [\text{RR}'\text{NH}_2^+]_{(\text{org.})} / [\text{H}]_{(\text{org.})} = A / (2 \cdot \epsilon \cdot l \cdot [\text{H}]_{(\text{org.})}) \quad (7)$$

Et où:  $K_a$  est la constante d'association (exprimée en  $\text{M}^{-1}$ )

$R^*$  est le rapport molaire de l'ammonium par rapport au ligand dans la phase organique, à l'équilibre (sans dimension)

$K_d$  est la constante de distribution. Elle est estimée à  $1 \text{ M}^{-1}$ , valeur considérée comme optimale (103)

$[\text{RR}'\text{NH}_2^+]_{(\text{aq.})}$  est la concentration initiale en ammonium dans la phase aqueuse (M)

$[\text{H}]_{(\text{org.})}$  est la concentration initiale d'hôte (peptide) dans la phase organique (M)

$V$  est le volume de la phase (L)

$A$  est l'absorbance mesurée pour la phase organique à  $\lambda = 375 \text{ nm}$  ( $\lambda_{\text{max}}$  de l'ion picrate)

$l$  est la longueur du chemin optique (1 cm)

$\epsilon$  est le coefficient d'extinction molaire de l'ion picrate ( $\epsilon_{\text{max}} = 17400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (103).

### 4.3 Mesure des constantes d'association impliquant les peptides-hôtes à 2 éthers-couronne

#### 4.3.1 Objectif

Nous nous proposons de mesurer les  $K_a$  associées aux complexes formés entre les peptides **63**, **64**, **67** et **68** d'une part, et le dipicrate de la diamine **82**

(DA•2Pic, **90**), c'est à dire l'homologue de DA•2PF<sub>6</sub>. Nous mesurerons également les K<sub>a</sub> impliquant les mêmes peptides et le dipicrate de la 1,6-hexanediamine (Hex•2Pic, **91**), c'est à dire un diammonium aliphatique primaire.

#### 4.3.2 Conditions expérimentales

Nos conditions sont adaptées de celles utilisées par Nolte *et al.* (104). Nous préparons des solutions aqueuses des deux picrates d'ammoniums, que nous dosons par absorbance visible à 375 nm. DA•2Pic est très peu soluble dans l'eau et une solution saturée de ce sel est dosée à  $1.34 \cdot 10^{-4}$  M de picrates. Nous noterons que ce sont les picrates qui sont dosés au cours de l'expérience, mais que la concentration effective en invité est deux fois moindre.

400 µL de ces solutions sont agités vigoureusement en présence de 400 µL de solution de peptide à 1 mM dans le chloroforme. Les mélanges sont ensuite centrifugés, puis un aliquot de phase organique est prélevé et sa teneur en picrates est dosée. Chaque expérience est reproduite 3 fois et chaque lecture d'absorbance est effectuée 5 fois. Une expérience de contrôle est effectuée en utilisant 400 µL de solution de picrates et 400 µL de chloroforme. La valeur de l'absorbance dosée dans ce cas est soustraite de celle dosée lors des essais.

Les valeurs de K<sub>a</sub> ont été calculées en considérant la formation de complexes 1:1. Malgré cela, nous avons effectué des essais sur BOC-BEC-OMe **80**, à une concentration de 2 mM.

### 4.3.3 Résultats

Les résultats obtenus ont été consignés dans le Tableau 11. Nous signalerons tout d'abord que vues les valeurs relativement basses des  $K_a$  déterminées, la marge d'erreur est assez importante, cette technique de mesure étant principalement rapportée pour des  $K_a$  de l'ordre de  $10^7 \text{ M}^{-1}$  (89c). De plus, la faible concentration de la solution-mère de DA•2Pic ajoute encore à cette incertitude. Nous noterons enfin que les valeurs rapportées dans le cas du peptide 67 sont peut-être surestimées du fait de la forte émulsion qui se produit lors de l'agitation, que même la centrifugation ne pouvait briser que difficilement.

**Tableau 11.** Valeur des  $K_a$  à 25 °C pour les différents hôtes et invités

Hôte	Invité	$K_a (10^4 \cdot \text{M}^{-1})$
BOC-BEC-OMe <u>80</u>	DA•2Pic	non déterminable
<u>63</u>	DA•2Pic	48
<u>64</u>	DA•2Pic	44
<u>67</u>	DA•2Pic	160
<u>68</u>	DA•2Pic	50
BOC-BEC-OMe <u>80</u>	Hex•2Pic	non déterminable
<u>63</u>	Hex•2Pic	1.8
<u>64</u>	Hex•2Pic	2.0

Hôte	Invité	$K_a$ ( $10^4 \cdot M^{-1}$ )
<u>67</u>	Hex•2Pic	4.7
<u>68</u>	Hex•2Pic	1.5

La lecture de ces résultats permet de faire immédiatement deux constatations: 1) tous les peptides présentent des constantes d'association de 20 à 35 fois supérieures avec DA•2Pic qu'avec Hex•2Pic. 2) Les peptides présentent des valeurs de  $K_a$  similaires avec chaque invité, à l'exception de 67.

De plus, le monomère éther-couronne n'extrait aucun des deux picrates. Certes, la formation de complexes 2:1 dans son cas prohibait le calcul de  $K_a$ , mais l'on était néanmoins en droit de s'attendre à un certain niveau d'extraction.

Même si le contre-ion est différent, ainsi que les méthodes de détermination, on peut être tenté de comparer le  $K_a$  obtenu pour le moins bon ligand du diammonium DA•2Pic ( $440000 M^{-1}$ ) avec le meilleur rapporté par Stoddart *et al.* ( $27000 M^{-1}$ ) (88a) dans le cas du complexe DB24C8-hexafluorophosphate de dibenzylammonium 73 (Figure 56). Cependant, dans ce dernier cas, les valeurs de  $K_a$  ont été déterminées par RMN, en raison de la moindre complexité des spectres, et sont *a priori* beaucoup plus fiables.

#### 4.4 Conclusion

Au delà des valeurs absolues des constantes d'association (puisque nous avons changé de contre-ion par rapport aux chapitres 2 et 3), nous préférons retenir trois éclaircissements apportés par cette série d'expériences:

1) La preuve supplémentaire de l'effet de coopérativité dont bénéficient les peptides dans la complexation de leur invité, par rapport au monomère BOC-BEC-OMe.

2) La similarité de la valeur des  $K_a$  quel que soit le peptide impliqué, donc la faible influence du squelette peptidique. Une exception est peut-être le peptide 67, qui semble également le moins organisé des quatre sous sa forme libre. Il serait donc celui qui prendrait le plus facilement la conformation nécessaire à la complexation, soit le tournant  $\beta$  dans son cas. Dans le cas du peptide 64, sa préorganisation pour la complexation serait contrebalancée par une distance plus importante, et plus prohibitive, entre les éthers-couronne.

3) Enfin, et peut-être le plus important, tous les hôtes complexent mieux un diammonium secondaire polybenzylique (DA•2Pic) qu'un primaire aliphatique (Hex•2Pic). Certes, les éthers-couronne de grande taille sont reconnus pour être de mauvais ligands pour les ammoniums primaires (105); mais comment expliquer alors que nous observions la complexation d'ammoniums secondaires encombrés par nos peptides ? La seule façon semble être que ce type d'invité permet la formation de pseudorotaxanes stables par création de liens hydrogène  $[N^+-C-H...O]$  plus forts et surtout, des interactions  $\pi-\pi$  aromatiques.

## CONCLUSION

En mettant en commun l'ensemble des informations obtenues lors de nos différentes expériences, nous pouvons conclure en disant que nous avons réussi à former des [2]pseudorotaxanes peptidiques; et ce, au moins dans le cas des peptides à 2 éthers-couronne.

Certes, nos tentatives de cristallisation des complexes sont restées vaines. Et il est clair que l'obtention d'une structure cristalline resterait la meilleure preuve de succès. Néanmoins, les analogies flagrantes entre nos résultats en RMN et spectrométrie de masse, et les travaux de Stoddart *et al.* ne laissent pas planer beaucoup de doute.

De plus, les études de DC ont appuyé nos conclusions, en démontrant les changements conformationnels drastiques subis par les peptides en présence de l'invité. La conformation adoptée par le squelette de l'hôte complexé semble relativement rigide. La formation du pseudorotaxane apparaissant dès lors comme un moyen de figer un court peptide dans une structure organisée précise, indépendamment de la composition de ce peptide.

Le fait de n'avoir obtenu que des indices de succès dans le cas des peptides à 3 éthers-couronne tendrait à conforter une ébauche de conclusion énoncée après nos mesures de  $K_a$ : une préorganisation présente dans le peptide libre serait défavorable à la complexation. Cette préorganisation était évidente dans le cas des peptides à trois couronnes. Elle existait à l'état d'ébauche dans les polyleucines à 2 couronnes. Et le fait de l'existence d'un niveau supérieur de rigidité dans le peptide 68 a fait naturellement de 67 le meilleur hôte dans

la complexation de  $\text{DA} \cdot 2\text{PF}_6$ . Cependant, les différences de  $K_a$  restent suffisamment faibles pour confirmer que la nature du squelette peptidique a relativement peu d'influence sur la formation du pseudorotaxane. Ceci demeurant vrai tant que la stabilisation produite par la complexation peut compenser le coût énergétique lié à l'organisation ou la réorganisation du peptide.

Nos projets futurs pourraient viser à obtenir des peptides de niveau supérieur, comportant plusieurs couronnes. De plus, nous envisageons de faire tendre nos composés vers une structure de rotaxane, en utilisant, par exemple, un invité modifiable chimiquement, de façon à le fixer à l'intérieur du peptide-hôte une fois produite la complexation. Nous espérons ainsi obtenir des espèces plus cristallogènes ou, pour le moins, de faciliter les études conformationnelles par RMN en permettant l'observation d'une seule espèce chimique.

Au cours de ce projet, nous avons mis en évidence la possibilité d'exercer un contrôle sur la conformation d'un petit peptide par des moyens relativement simples, et de façon réversible. Ceci pourrait être très intéressant vu la propension que possèdent ces composés à adopter des structures aléatoires en solution. Or, certains courts peptides possèdent des propriétés de messenger chimique, impliquant qu'ils adoptent une conformation très précise. Trouver une voie pour imposer à certains peptides biomimétiques une structure non favorisée, par la simple addition d'un invité bien défini, ouvrirait des perspectives intéressantes, tant au niveau de la compréhension de leur mode d'action que d'une éventuelle mise en application thérapeutique.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**



Dans les deux parties de ce travail, nous avons essayé de mettre en évidence le potentiel et la polyvalence des polypeptides, que ce soit dans le domaine de la synthèse de composés à l'échelle du nanomètre ou dans celui de la supramolécularité. Bien qu'il reste beaucoup de travail à faire dans le domaine, nous avons tenté d'obtenir une activité ou des propriétés associés à nos composés, par le contrôle de leur conformation en solution. Ce contrôle conformationnel a soit été prévu de par la nature chimique de la molécule-cible (hélice  $\alpha$  du modèle de canal ionique) ou imposé au peptide dans le cours de sa fonction (tournant  $\beta$  des pseudorotaxanes).

Dans ces deux projets, nous avons non seulement visé la préparation de composés chimiquement bien définis mais, également, la création d'une fonction. L'observation de l'efficacité de nos molécules constituait en fait la composante essentielle du travail et, c'était bien là que reposait la plus grande partie du défi qu'il constituait. Ces fonctions ont été obtenues, même si elles furent parfois difficiles à observer.

A une époque où les mots « biosenseur » ou « machine moléculaire » sont plus fréquemment employés en chimie, nous pensons avoir produit deux modes d'approche possible de ces cibles, les pseudorotaxanes présentant un potentiel intéressant pour la préparation de systèmes logiques au niveau moléculaire ou l'efficacité des ionophores.

Bien sûr, il nous reste beaucoup d'améliorations à apporter à nos composés en termes d'efficacité ou de sélectivité. Néanmoins, nous pensons avoir réussi à tirer profit des qualités intrinsèques des peptides en terme de chiralité ou de prévision conformationnelle. Ces propriétés en ont fait des composants essentiels de la matière vivante.

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

## 1. REMARQUES GÉNÉRALES

Les solvants et réactifs utilisés pour les réactions ont été traités ou purifiés de la façon suivante:

- Dichlorométhane (DCM), distillé
- Diméthylformamide (DMF), dégazé à l'azote
- Eau, distillée, déionisée et filtrée sur membrane 0.45  $\mu\text{m}$
- Tetrahydrofurane (THF), distillé
- Hexanes, distillé
- *n*-Propylamine, distillée

et les autres solvants utilisés directement:

- Méthanol, qualité spectroscopie (Omnisolv<sup>®</sup>, EM Science)
- Acétonitrile, qualité spectroscopie (Optima, Fisher)
- Éther, réactif ACS (ACP)
- Chloroforme, qualité spectroscopie (assured<sup>®</sup>, BDH)
- Dioxane, réactif ACS (Aldrich)
- 2,2,2-Trifluoroéthanol (TFE), qualité RMN (Aldrich)
- 1,2-Dichloroéthane (DCE), qualité HPLC (Aldrich)

Les spectres de résonance magnétique (RMN) du proton et du carbone ont été enregistrés avec des appareils Varian XL-200 et Brüker WM-300 ou AMX2-500. Les déplacements chimiques sont rapportés en partie par million (ppm). Le standard interne est le pic résiduel du solvant. Les abréviations suivantes ont été utilisées dans l'interprétation des spectres:

- $\delta$ : déplacement chimique
- s: singulet
- d: doublet
- t: triplet
- dd: doublet de doublet
- m: multiplet ou massif

Les indices de rotation ont été mesurés à température de la pièce à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco DIP-360, en utilisant une cellule de quartz possédant un chemin optique de 10 cm. Les spectres de masse (SM) ont été enregistrés sur un spectromètre VG Autospec Q (FAB, Centre Régional de Spectrométrie de Masse, Université de Montréal) ou Perkin Elmer API-III triple quadripôle (ES, University of Toronto). Les mesures spectrophotométriques ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-visible Hewlett-Packard HP 8450-A et un spectrophotomètre infrarouge FT-IR Nicolet Magna-IR 550. Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Gallenkamp et n'ont pas été corrigés.

Les études de dichroïsme circulaire ont été réalisées à l'aide d'un spectropolarimètre Jasco J-710, en utilisant des cellules cylindriques en quartz possédant des chemins optiques variant de 0.01 à 0.1 cm.

Les dosages analytiques et les purifications de peptides ont été effectuées sur un appareil de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) Hewlett Packard HP 1050, muni d'un détecteur spectrophotométrique à diodes en réseau, à l'aide de colonnes à phase inversée Vydac (C-18 analytique 0.46

cm x 25 cm ou C-18 semi-préparative 2.5 cm x 25 cm). Tous les éluants ont été additionnés de 0.1 % d'acide trifluoroacétique. Les tests HPLC analytiques ont été réalisés au débit de 1 mL/min, avec les gradients d'éluants suivants: (A) MeCN-eau 50:50 (2 min) - 100:0 (45 min) (B) MeCN-*i*-propanol-eau 33:17:50 (2 min) - 67:33:0 (45 min) (C) MeCN-*i*-propanol-eau 60:30:10 (2 min) - 67:33:0 (30 min) (D) MeCN-eau 10:90 (2 min) - 100:0 (45 min) (E) MeCN-*i*-propanol-eau 67.5:22.5:0 (2 min) - 75:25:0 (45 min) (F) MeCN-*i*-propanol-eau 60:20:0 (2 min) - 75:25:0 (45 min) (G) MeCN-*i*-propanol-eau 53:27:20 (2 min) - 67:33:0 (45 min) (H) MeCN-*i*-propanol-eau 40:20:40 (2 min) - 67:33:0 (30 min).

Les chromatographies-éclair sur colonne ont été réalisées en utilisant un gel de silice de maille 230-400 (Silicycle) comme adsorbant et une pression positive d'azote. Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice de 0.25 mm d'épaisseur (Merck 60 F<sub>254</sub>). Les composés ont été détectés après exposition à la lumière ultraviolette ou aux révélateurs suivants: ninhydrine, acide phosphomolybdique ou nitrate d'ammonium cérique. Les éluants suivants ont été utilisés: (A) DCM (B) DCM-MeOH 9:1 (C) DCM-MeOH 8:2 (D) hexanes-acétone 3:1 (E) hexanes-acétone 3:2 (F) chloroforme-MeOH-acide acétique 6:3:1.

Les mesures de conductivité monomoléculaire ont été réalisées à l'aide d'un appareillage « *patch-clamp* » Axopatch 1D (Axon Instruments) et les données ont été analysées à l'aide du logiciel Synapse (Synergistic Research Systems) sur un ordinateur Macintosh.

Les acides aminés ont été achetés chez Advanced Chemtech et les lipides chez Avanti Lipids. Tous les autres produits chimiques ont été fournis par Aldrich.

Les autres abréviations utilisées sont:

- $[\alpha]_D$ : pouvoir rotatoire
- anlt: analytique
- déc.: décomposition
- éq: équivalent
- exp: expérimental
- g: gramme
- h: heure
- L: litre
- litt: selon la littérature
- $M^+$ : ion moléculaire
- min: minute
- mol: mole
- $P_f$ : point de fusion
- Rdt: rendement
- $R_f$ : rapport frontal
- $R_t$ : temps de rétention
- s: seconde
- TP: température de la pièce

## 2. SYNTHÈSES

### 2.1 SYNTHÈSES EN SOLUTION

#### 1,17-Dibromo-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadécane (15)

Nous suspendons de la triphénylphosphine (92.9 g, 354 mmol) dans de l'acétonitrile (400 mL), sous atmosphère inerte, et amenons la suspension à 0 °C. Nous additionnons à la goutte, sur une période de 45 min, du brome (56.6 g, 354 mmol). Nous ajoutons à la goutte de l'hexaéthylène glycol (50.0 g, 177 mmol) dissous dans de l'acétonitrile (60 mL). Après 48 h, le précipité blanc est filtré. Nous évaporons le filtrat à sec pour obtenir un résidu pâteux jaune-orangé. Celui-ci est extrait plusieurs fois par l'hexane. Après évaporation du solvant sous vide, nous recueillons le produit (15) désiré sous forme d'huile limpide et incolore (60.5 g, Rdt = 84 %). SM (ES):  $m/z$  409 =  $(M + H)^+$ , 426 =  $(M + NH_4)^+$ ; RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  3.80 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 3.65 (m, 16H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.46 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br).

#### 1,11-Dibromo-3,6,9-trioxaundécane (37)

Nous utilisons le protocole de synthèse du composé (15), avec les quantités suivantes:

- triphénylphosphine (108.1 g, 412 mmol)

- brome (65.8 g, 412 mmol)
- tétraéthylène glycol (40.0 g, 206 mmol)
- acétonitrile (500 mL + 70 mL).

Nous recueillons le composé **(37)** désiré sous la forme d'une huile limpide et incolore (63.9 g, Rdt = 97 %). SM (ES):  $m/z$  321 = (M + H)<sup>+</sup>, 338 = (M + NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.79 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br), 3.65 (m, 8H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.45 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Br).

### **Chlorhydrate de l'ester méthylique de la 3-(3,4-Dihydroxyphényl)-L-alanine (38) (37a)**

Dans du méthanol (600 mL), partiellement séché sur MgSO<sub>4</sub> anhydre, nous additionnons à la goutte du chlorure de thionyle (125 mL, 1.71 mol), à 0 °C, sur une période d'1 h. De la L-DOPA (60.0 g, 304 mmol) est ajoutée par petites fractions dans la solution. Le mélange, protégé par un tube à CaCl<sub>2</sub>, est ramené à TP. Après 48 h, le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est trituré à l'éther anhydre pendant 12 h. Nous filtrons le précipité pour obtenir l'ester **(38)** sous forme d'une poudre très blanche (73.7 g, Rdt = 98 %).  $P_f$  exp = 172-173 °C;  $P_f$  litt = 172-174 °C (37a); CCM: (F)  $R_f$  = 0.42;  $[\alpha]_D$  exp = +7.4° ( $c$  = 1, MeOH);  $[\alpha]_D$  litt = +7.8° ( $c$  = 1, MeOH) (37a); SM (FAB):  $m/z$  211 = (M - HCl)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): δ 8.94 (s, 1H, HO-Ph), 8.91 (s, 1H, HO-Ph), 8.43 (m, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 6.66 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, **H5** Ar), 6.57 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, **H2** Ar), 6.42 (dd,  $^3J$  = 7.9 Hz,  $^4J$  = 2.1 Hz, 1H, **H6**



Ar), 4.14 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H, C $\alpha$ H), 3.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.92 (m, 2H, C $\beta$ H<sub>2</sub>); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>):  $\delta$  169.3, 145.2, 144.5, 124.6, 120.0, 116.6, 115.7, 53.4, 52.5, 35.2.

**Ester méthylique de la *N*-*t*-Butyloxycarbonyl-3-(3,4-dihydroxyphényl)-L-alanine (37a)**

**BOC-L-DOPA-OMe (17)**

Nous mettons **(38)** (73.5 g, 297 mmol) en suspension dans du THF anhydre (400 mL) à 0 °C, sous atmosphère inerte. Nous ajoutons de la DIEA (51.7 mL, 297 mmol) sur une période de 10 min. Puis, nous additionnons du di-*t*-butyldicarbonate (64.8 g, 297 mmol) dissous dans du THF anhydre (200 mL), à la goutte, sur une période de 45 min. Nous amenons à TP et protégeons la solution par un tube à CaCl<sub>2</sub>. Après 24 h, le solvant est évaporé sous vide pour donner une huile mauve. Celle-ci est reprise par du DCM (300 mL) et lavée par HCl 0.5 N (2 x 300 mL), NaHCO<sub>3</sub> saturé (300 mL) et de la saumure (300 mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est trituré à l'éther anhydre pendant 12 h. Nous filtrons le précipité pour obtenir la BOC-L-DOPA-OMe **(17)** sous la forme d'une poudre très blanche (74.8 g, Rdt = 81 %).  $P_f$  exp = 135-136 °C;  $P_f$  litt = 133-135 °C (37a); CCM: (B)  $R_f = 0.59$ ;  $[\alpha]_D$  exp = +6.3° ( $c = 1$ , MeOH);  $[\alpha]_D$  litt = +7.6° ( $c = 1.2$ , MeOH) (37a); SM (FAB):  $m/z$  311 = M<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>):  $\delta$  8.74 (s, 1H, HO-Ph), 8.69 (s, 1H, HO-Ph), 7.16 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, NH), 6.60 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, **H5** Ar), 6.57 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, **H2** Ar), 6.43 (dd,  $^3J = 8.0$  Hz,  $^4J = 2.0$  Hz, 1H, **H6** Ar), 4.02 (m,

1H, C $\alpha$ H), 3.58 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.70 (m, 2H, C $\beta$ H<sub>2</sub>), 1.33 (s, 9H, H *t*-Bu); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>):  $\delta$  172.7, 155.3, 144.8, 143.8, 128.1, 119.7, 116.3, 115.2, 78.2, 55.6, 51.6, 35.9, 28.0.

**Ester méthylique de la *N*-*t*-Butyloxycarbonyl-3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanine**

**BOC-ECV-OMe (18)**

Sous atmosphère inerte, nous dissolvons de la BOC-L-DOPA-OMe (**17**) (25.0 g, 80.3 mmol) dans du DMF (800 mL) dégazé et séché sur KOH. Nous ajoutons du carbonate de césium anhydre (26.2 g, 80.4 mmol). Nous agitons à 50 °C pendant 2 h. Puis, nous additionnons le dibromure (**15**) (32.8 g, 80.4 mmol) dissous dans du DMF dégazé et sec (200 mL), à la goutte, sur une période de 2 h. La suspension est agitée pendant 72 h en maintenant la température à 50 °C. Par la suite, le DMF est évaporé sous vide poussé. Le résidu très brun est repris par du DCM (200 mL) et lavé à la NaOH 1 N (2 x 200 mL) et à la saumure (200 mL). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et le solvant est évaporé sous vide. L'huile très brune obtenue est purifiée par chromatographie-éclair sur colonne (gel de silice, gradient de méthanol 2-6 % dans le DCM) pour donner une huile brune. Le composé (**18**) désiré est précipité sous forme de poudre beige par trituration dans un mélange éther-hexanes (20.5 g, Rdt = 46 %). P<sub>f</sub> exp = 60-63 °C; CCM: (B) R<sub>f</sub> = 0.58; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> exp = +4.8° (c = 1, MeOH); SM (FAB): *m/z* 557 = M<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>):  $\delta$  7.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.84-6.82 (m, 2H, **H2** et **H5** Ar), 6.69 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8.1 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.3 Hz, 1H, **H6** Ar), 4.11 (m, 1H, C $\alpha$ H),

4.06-4.01 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-OPh), 3.75-3.70 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OPh), 3.60-3.53 (m, 16H, CH<sub>2</sub>-O), 3.50 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.92-2.70 (m, 2H, CβH<sub>2</sub>), 1.32 (s, 9H, H *t*-Bu); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 172.2, 154.9, 148.7, 147.9, 128.9, 121.9, 115.2, 114.1, 79.8, 71.0, 70.9, 70.4, 69.6, 69.6, 69.1, 54.3, 52.0, 37.6, 28.2.

### Ester méthylique de la *N*-*t*-Butyloxycarbonyl-3-(3,4-(15-couronne-5)-phényl)-L-alanine

#### BOC-ECQ-OMe (39)

Nous utilisons le protocole de synthèse du composé (18), avec les quantités suivantes:

- BOC-L-DOPA-OMe (17) (29.8 g, 95.7 mmol)
- carbonate de césium anhydre (31.2 g, 95.8 mmol)
- dibromure (37) (30.7 g, 95.8 mmol)
- DMF (1200 mL + 200 mL).

Nous recueillons le composé (39) désiré sous la forme d'une huile limpide jaune (m = 34.2 g). Cette huile, que nous ne parvenons pas à précipiter, sera utilisée telle quelle. CCM: (B) R<sub>f</sub> = 0.48; [α]<sub>D</sub> exp = +4.1° (c = 1, MeOH); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H5 Ar), 6.65-6.62 (m, 2H, H2 et H6 Ar), 4.96 (m, 1H, NH), 4.50 (m, 1H, CαH), 4.11-4.08 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-OPh), 3.90-3.87 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OPh), 3.76-3.74 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-O), 3.68 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 2.99-2.97 (m, 2H, CβH<sub>2</sub>), 1.41 (s, 9H, H *t*-Bu).

### ***N-t*-Butyloxycarbonyl-3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanine**

#### **BOC-ECV-OH (14)**

Nous dissolvons du BOC-ECV-OMe (**18**) (20.4 g, 36.6 mmol) dans du méthanol (50 mL). Nous amenons à 0 °C et additionnons de la NaOH 1 N. Nous remettons à TP et agitons pendant 3 h. La solution est alors amenée à pH = 2-3 par du HCl 1 N puis, le méthanol est évaporé sous vide. La suspension résultante est extraite au DCM (3 x 200 mL). La phase organique est lavée à la saumure, séchée sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et le solvant est évaporé sous vide pour donner un solide doré moussieux. Le composé (**14**) désiré est précipité sous forme de poudre jaune pâle par trituration dans un mélange méthanol-éther-hexanes (17.6 g, Rdt = 88 %).  $P_f \text{ exp} = 62-65 \text{ }^\circ\text{C}$ ; CCM (F)  $R_f = 0.78$ ;  $[\alpha]_D \text{ exp} = +12.1^\circ$  ( $c = 1$ , MeOH); SM (FAB):  $m/z$  543 =  $M^+$ ; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  6.81 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, **H5** Ar), 6.77 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, **H2** Ar), 6.72 (dd,  $^3J = 7.5$  Hz,  $^4J = 1.9$  Hz, 1H, **H6** Ar), 5.01 (m, 1H, NH), 4.51 (m, 1H, C $\alpha$ H), 4.19-4.15 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-OPh), 3.90-3.87 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OPh), 3.79-3.62 (m, 16H, CH<sub>2</sub>-O), 3.06-3.04 (m, 2H, C $\beta$ H<sub>2</sub>), 1.43 (s, 9H, **H** *t*-Bu); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  174.0, 155.2, 148.5, 147.7, 129.2, 122.1, 115.4, 114.1, 79.7, 70.8, 70.6, 70.1, 69.6, 69.0, 68.9, 54.1, 37.2, 28.2.

### ***N-t*-Butyloxycarbonyl-3-(3,4-(15-couronne-5)-phényl)-L-alanine**

#### **BOC-ECQ-OH (19)**

Nous utilisons le protocole de synthèse du composé (**14**), avec les quantités suivantes:

- BOC-ECQ-OMe (**39**) (34.0 g)
- méthanol (80 mL)
- NaOH 1 N (100 mL)

Le composé (**19**) désiré est précipité sous forme de poudre jaune pâle par trituration dans un mélange méthanol-éther-hexanes (16.7 g, Rdt = 38 % pour les 2 étapes).  $P_f \text{ exp} = 72-74^\circ\text{C}$ ; CCM (F)  $R_f = 0.65$ ;  $[\alpha]_D \text{ exp} = +20.5^\circ$  ( $c = 1.5$ , MeOH); SM (ES):  $m/z$  455 =  $M^+$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.78 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, **H5** Ar), 6.72-6.69 (m, 2H, **H2** et **H6** Ar), 5.01 (m, 1H, NH), 4.51 (m, 1H,  $\text{C}\alpha\text{H}$ ), 4.12-4.09 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-OPh}$ ), 3.91-3.87 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OPh}$ ), 3.77-3.74 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.04-3.02 (m, 2H,  $\text{C}\beta\text{H}_2$ ), 1.42 (s, 9H, **H** *t*-Bu); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  174.4, 155.3, 148.5, 147.6, 129.4, 122.2, 114.9, 113.8, 79.9, 70.5, 70.1, 69.2, 68.6, 54.3, 37.4, 28.3.

### Résine de Kaiser (résine oxime) (**20**) (**39**)

Nous introduisons du polystyrène (100 g), en billes de maille 200-400 réticulées par 1 % de divinylbenzène, dans un ballon de 3 L et nous le gonflons avec du DCM (750 mL). Nous dissolvons du chlorure d'acide *p*-nitrobenzoïque (17.0 g, 91.6 mmol) dans du DCM (500 mL) et l'ajoutons à la suspension de polystyrène. Puis, du chlorure d'aluminium (17.0 g, 127.5 mmol) en suspension dans du DCM (500 mL) est additionné par petites fractions. Nous bouchons le ballon et agitions de façon manuelle, à intervalles

de temps réguliers. Après 48 h, la suspension est filtrée, puis la résine est soumise à la séquence de lavage suivante: dioxane-HCl 4N 3:1 (3 L); dioxane-eau 3:1 (2 L); DMF (2 L); méthanol (2 L). Par la suite, la résine est gonflée au DCM (1 L) puis, contractée au méthanol (1 L), filtrée et séchée sous vide.

La résine est mise en suspension dans un mélange éthanol-pyridine 5:1 (900 mL). Nous ajoutons du chlorhydrate d'hydroxylamine (100 g, 1.44 mol) et portons à reflux sans agitation. Après 24 h, la résine est filtrée puis, soumise à la séquence de lavage suivante: méthanol-eau 3:1 (2 x 1.6 L); DMF (1.6 L); DCM (1.6 L); méthanol (1.6 L); DCM (1.6 L); méthanol (2 x 1.6 L). La résine oxime (**20**) désirée est finalement séchée sous vide ( $m = 113$  g).

### ***O*-Triphénylméthyl-3,6-dioxaoctane-1,8-diol (75)**

A une solution de triéthylène glycol (70.0 g, 466 mmol) dans du DCM (300 mL), nous ajoutons du chlorure de triphénylméthyle (65.2 g, 234 mmol), de la triéthylamine (36.3 g, 359 mmol) et de la 4-diméthylaminopyridine (1.3 g, 11 mmol). Nous agitons 1 h à 0 °C puis, 12 h à TP. Le milieu réactionnel est lavé par HCl 1 N (2 x 500 mL), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 % (500 mL) et de la saumure (500 mL). Puis, nous séchons la phase organique sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporons le solvant. Le résidu est dissous dans de l'éthanol 95 % (800 mL). Le composé diprotogé cristallise et est éliminé par filtration puis, l'éthanol est évaporé sous vide. Nous purifions l'huile bordeaux résultante par chromatographie-éclair sur colonne (gel de silice, gradient d'acétone dans l'hexane 25-50 %) pour obtenir le produit (**75**) désiré sous la forme d'une huile dorée (57.4 g, Rdt = 62 %). CCM: (D)  $R_f =$

0.22; SM (FAB):  $m/z$  392 =  $M^+$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.49-7.46 (m, 6H, *m*-H Ar), 7.32-7.20 (m, 9H, 6 *o*-H et 3 *p*-H Ar), 3.74-3.61 (m, 10H, 5  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.26 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O-CPh}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  144.0, 128.6, 127.7, 126.8, 86.5, 72.4, 70.7, 70.6, 70.4, 63.2, 61.7.

***O*-Triphénylméthyl-*O'*-*p*-toluènesulfonyl-3,6-dioxaoctane-1,8-diol (76)**

Nous dissolvons (**75**) (57.3 g, 146 mmol) dans de la pyridine distillée et sèche (250 mL) sous atmosphère inerte et ajoutons du chlorure de *p*-toluènesulfonyle (36.4 g, 191 mmol). La solution est agitée à 4 °C pendant 18 h. A la fin, la suspension est versée dans un mélange eau-glace et agitée pendant 1 h. Nous ajoutons de l'éther (500 mL) et extrayons la mixture par HCl 2 N (2 x 500 mL),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5 % (500 mL) et à la saumure (500 mL). Puis, nous séchons la phase organique sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre et évaporons le solvant sous vide pour obtenir le produit (**76**) désiré sous la forme d'un solide rose (67.5 g, Rdt = 85 %).  $P_f \text{ exp}$  = 67-70 °C; CCM: (D)  $R_f$  = 0.35; SM (FAB):  $m/z$  546 =  $M^+$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.78 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, *o*-H Ar Ts), 7.48-7.44 (m, 6H, *m*-H Ar trityl), 7.31-7.20 (m, 11H, 6 *o*-H Ar et 3 *p*-H Ar trityl + 2 *m*-H Ar Ts), 4.16 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-OTs}$ ), 3.71 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OTs}$ ), 3.66-3.59 (m, 6H, 3  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.23 (t,  $J$  = 5.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O-CPh}_3$ ), 2.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  144.6, 144.0, 132.8, 129.7, 128.6, 127.9, 127.6, 126.8, 86.4, 70.8, 70.6, 69.1, 68.7, 63.2, 21.5.

### ***O,O'*-Bis-(8-triphénylméthoxy-3,6-dioxaoctanyl)-catéchol (77)**

Nous introduisons du carbonate de potassium anhydre (36.2 g, 262 mmol) dans de l'acétonitrile sec et dégazé (400 mL). La suspension est soniquée sous atmosphère inerte pendant 30 min. Nous ajoutons du catéchol (7.1 g, 64 mmol) et mettons le mélange à reflux pendant 2 h. Une solution de (76) dans de l'acétonitrile sec et dégazé (200 mL) est additionnée à la goutte pendant 2 h. La suspension résultante est agitée pendant 48 h à reflux d'acétonitrile. A la fin, le solvant est évaporé sous vide et nous ajoutons du DCM (500 mL). Nous lavons la solution avec de la NaOH 1 N (2 x 500 mL) et de la saumure (500 mL). Puis, nous séchons la phase organique sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporons le solvant sous vide. Nous obtenons le produit (77) désiré sous la forme d'une huile brun très foncé (51.5 g, Rdt = 97 %). CCM: (D) R<sub>f</sub> = 0.35, (E) R<sub>f</sub> = 0.62; SM (FAB):  $m/z$  375 = (M - 2 trityls + 3H)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.48-7.44 (m, 12H, *m*-H Ar trityl), 7.31-7.20 (m, 18H, 12 *o*-H et 6 *p*-H Ar trityl), 6.92-6.85 (m, 4H, H Ar catéchol), 4.15 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H, 2 CH<sub>2</sub>-OPh), 3.85 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H, 2 CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OPh), 3.74-3.65 (m, 12H, 6 CH<sub>2</sub>-O), 3.23 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H, 2 CH<sub>2</sub>-O-CPh<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 149.8, 144.0, 128.6, 127.6, 126.8, 121.5, 115.0, 86.4, 70.8, 70.7, 70.6, 69.7, 68.8, 63.2.

### ***O,O'*-Bis-(8-hydroxy-3,6-dioxaoctanyl)-catéchol (78)**

Nous préparons une solution de (77) (51.3 g, 60 mmol) dans du DCM (100 mL) puis, nous ajoutons de l'acide *p*-toluènesulfonique (2.15 g, 11.3 mmol) et du méthanol (900 mL). La solution est agitée pendant 4 h à TP.



Puis, nous additionnons de la triéthylamine (1.14 g, 11.3 mmol) et évaporons les solvants sous vide. Le résidu est purifié par chromatographie-éclair sur colonne (gel de silice, gradient de méthanol dans le DCM 5-10 %). Nous obtenons le produit **(78)** désiré sous la forme d'une huile dorée (21.8 g, Rdt = 97 %). CCM: (B)  $R_f = 0.47$ ; SM (ES):  $m/z$  375 =  $(M + H)^+$ ; RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  6.87 (m, 4H, **H** Ar), 4.13 (t,  $J = 4.7$  Hz, 4H, 2  $CH_2$ -OPh), 3.85 (t,  $J = 4.7$  Hz, 4H, 2  $CH_2$ - $CH_2$ -OPh), 3.72-3.63 (m, 12H, 6  $CH_2$ -O), 3.56 (t,  $J = 4.4$  Hz, 4H, 2  $CH_2$ -OH); RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  148.5, 121.4, 114.0, 72.6, 70.6, 70.1, 69.5, 68.3, 61.5.

#### ***O,O'*-Bis-(1-*p*-toluènesulfonyl-3,6-dioxaoctanyl)-catéchol (79)**

Nous préparons une solution de **(78)** (21.5 g, 57 mmol) dans de la pyridine distillée et sèche (200 mL) et ajoutons du chlorure de *p*-toluènesulfonyle (28.8 g, 156 mmol). Le mélange est agité à 4 °C, pendant 18 h, sous atmosphère inerte. A la fin, la suspension est versée dans un mélange eau/glace et agitée pendant 1 h. Nous ajoutons du DCM (500 mL) et extrayons avec du HCl 2 N (2 x 500 mL), du  $Na_2CO_3$  5 % (500 mL) et de la saumure (500 mL). Puis, nous séchons la phase organique sur  $MgSO_4$  anhydre et évaporons le solvant sous vide. Nous obtenons le produit **(79)** désiré sous la forme d'une huile jaune (33.0 g, Rdt = 84 %). CCM: (B)  $R_f = 0.68$ , (E)  $R_f = 0.36$ ; RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.77 (d,  $J = 8.4$  Hz, 4H, *o*-**H** Ar Ts), 7.31 (d,  $J = 8.4$  Hz, 4H, *m*-**H** Ar Ts), 6.89 (m, 4H, **H** Ar catéchol), 4.15-4.11 (m, 8H, 2  $CH_2$ -OPh + 2  $CH_2$ -OTs), 3.80 (t,  $J = 5.1$  Hz, 4H, 2  $CH_2$ - $CH_2$ -OPh), 3.69-3.64 (m, 8H, 4  $CH_2$ -O), 3.59 (t,  $J = 2.8$  Hz, 4H, 2  $CH_2$ -O), 2.41 (s, 6H, 2

CH<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 148.9, 144.7, 132.9, 129.7, 127.8, 121.6, 114.9, 70.7, 70.6, 69.7, 69.1, 68.8, 68.6, 21.5.

**Ester méthylique de la *N*-*t*-Butyloxycarbonyl-3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanine**

**BOC-BEC-OMe (80)**

Nous dissolvons de la BOC-L-DOPA-OMe (**17**) (13.2 g, 42.4 mmol) dans du DMF dégazé (1000 mL) puis, nous ajoutons du carbonate de césium anhydre (13.9 g, 42.5 mmol). La suspension est agitée pendant 2 h, à 50 °C, sous atmosphère inerte. Une solution du ditosylate (**79**) (29.0 g, 42.5 mmol) dans du DMF dégazé (250 mL) est alors additionnée à la goutte, sur une période de 3 h. Le mélange réactionnel est agité à 50 °C, sous atmosphère inerte, pendant 72 h. A la fin, nous évaporons le DMF sous vide et reprenons le résidu au DCM (500 mL). La solution est lavée à la NaOH 1 N (2 x 500 mL) et à la saumure (500 mL). Puis, nous séchons la phase organique sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporons le solvant sous vide. Nous purifions le résidu vert très foncé par chromatographie-éclair sur colonne (gel de silice, gradient de méthanol dans le DCM 2-5 %). Le solide obtenu est trituré à l'éther et nous obtenons le produit (**80**) désiré sous la forme d'une poudre rosée (19.1 g, Rdt = 70 %). P<sub>f</sub> exp = 90-91 °C; CCM: (B) R<sub>f</sub> = 0.51; [α]<sub>D</sub> exp = +3.4° (c = 1, MeOH); SM (FAB): *m/z* 649 = M<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.89 (m, 4H, **H** Ar catéchol), 6.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, **H5** Ar DOPA), 6.64-6.63 (m, 2H, **H2** et **H6** Ar DOPA), 4.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 4.53 (m, 1H, Cα**H**), 4.16 (t, *J* = 4.2 Hz, 4H, 2 CH<sub>2</sub>-OPh catéchol), 4.13 (t, *J* = 4.0 Hz, 4H, 2 CH<sub>2</sub>-OPh DOPA),

3.93-3.90 (m, 8H, 4 CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OPh), 3.83 (m, 8H, 4 CH<sub>2</sub>-O), 3.70 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.01-2.98 (m, 2H, CβH<sub>2</sub>), 1.42 (s, 9H, H *t*-Bu); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 172.2, 156.3, 148.9, 148.7, 147.7, 128.9, 121.9, 121.3, 115.0, 114.0, 113.9, 71.1, 69.8, 69.3, 69.0, 56.1, 52.0, 38.1, 28.2.

### ***N-t*-Butyloxycarbonyl-3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanine**

#### **BOC-BEC-OH (74)**

Nous dissolvons du BOC-BEC-OMe (**80**) (15.0 g, 23 mmol) dans du méthanol (150 mL). Puis, nous additionnons de la NaOH 1 N (150 mL) à 0 °C. La solution est agitée pendant 4 h à TP. A la fin, nous acidifions jusqu'à pH = 2-3 par du HCl 1 N. Le méthanol est alors évaporé sous vide et la suspension aqueuse est extraite au DCM (250 mL). Nous lavons la phase organique par NaHCO<sub>3</sub> saturé (250 mL) et à la saumure (250 mL). Puis, nous la séchons sur MgSO<sub>4</sub> anhydre et évaporons le solvant sous vide. Nous obtenons un solide mousseux brun. Le composé (**74**) désiré est précipité par trituration dans un mélange méthanol/éther/hexanes, sous la forme d'une poudre beige (12.1 g, Rdt = 83 %). P<sub>f</sub> exp = 85-90 °C; CCM: (F) R<sub>f</sub> = 0.85; [α]<sub>D</sub> exp = +8.0° (c = 1, MeOH); SM (ES): *m/z* 653 = (M + NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, 658 (M + Na)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.87 (m, 4H, H Ar catéchol), 6.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H5 Ar DOPA), 6.71-6.69 (m, 2H, H2 et H6 Ar DOPA), 5.05 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 4.54 (m, 1H, CαH), 4.19-4.12 (m, 8H, 4 CH<sub>2</sub>-OPh), 3.94-3.77 (m, 16H, 8 CH<sub>2</sub>-O), 3.03 (m, 2H, CβH<sub>2</sub>), 1.40 (s, 9H, H *t*-Bu); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 174.1, 156.8, 148.8, 148.7, 147.4, 130.3, 122.2, 121.5, 115.4, 114.2, 114.1, 70.8, 69.5, 69.3, 69.0, 54.9, 28.2.

### **1,4-Bis-(*N*-Benzyliminométhyl)-benzène (81)**

Dans un montage de Dean-Stark, nous dissolvons du téréphtalaldéhyde (3.00 g, 22.37 mmol) dans du benzène (100 mL). Nous ajoutons de la benzylamine distillée (4.79 g, 44.76 mmol) et portons à reflux pendant 10 h. A la fin, nous évaporons le benzène et obtenons le composé **(81)** désiré sous la forme d'une gomme jaune clair (6.99 g, Rdt = 100 %). SM (FAB):  $m/z$  312 =  $M^+$ ; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.42 (s, 2H,  $CH=N$ ), 7.87 (s, 4H,  $H$  Ar  $N=CH-Ph-CH=N$ ), 7.42-7.29 (m, 10H,  $H$  Ar Ph), 4.88 (s, 4H,  $CH_2$ ); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  161.4, 139.1, 138.2, 128.6, 128.5, 128.1, 127.1, 65.2.

### **1,4-Bis-(*N*-Benzylaminométhyl)-Benzène (82)**

Nous dissolvons la diimine **(81)** (6.8 g, 22.0 mmol) dans du méthanol (100 mL). Nous ajoutons peu à peu à cette solution du borohydrure de sodium (6.6 g, 174.5 mmol). Dès que le dégagement d'hydrogène a cessé, nous portons la solution à reflux pendant 18 h. Ensuite, nous l'amenons à 0 °C et additionnons lentement de l'HCl 2 N, jusqu'à obtention d'un pH = 2-3. Nous évaporons le méthanol sous vide puis, amenons le mélange à 0 °C. Nous additionnons de la NaOH en pastilles jusqu'à dissolution du précipité laiteux. Nous extrayons alors à l'éther (3 x 100 mL) et séchons la phase organique sur  $MgSO_4$  anhydre. Le solvant est évaporé sous vide et nous obtenons le produit **(82)** désiré sous la forme d'une huile jaune pâle (6.6 g, Rdt = 95 %). SM (FAB):  $m/z$  316 =  $M^+$ ; RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.36-7.28 (m, 14H,  $H$  Ar), 3.82 (s, 4H,  $CH_2-Ph-CH_2$ ), 3.81 (s, 4H,  $CH_2-Ph$ ), 1.61 (s, 2H,  $NH$ ); RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  140.3, 138.9, 128.3, 128.1, 128.0, 126.8, 53.1, 52.8.

## **Di-hexafluorophosphorhydrate du 1,4-Bis-(*N*-benzylaminométhyl)-benzène**

### **DA•2PF<sub>6</sub> (69)**

Nous dissolvons la diamine (**82**) (0.14 g, 0.44 mmol) dans du méthanol (2 mL) et ajoutons de l'acide hexafluorophosphorique 60 % en excès (80 µL). Nous évaporons le méthanol sous vide, reprenons le résidu par de l'eau très froide et filtrons. Le composé est lavé à l'eau froide puis, longuement séché. Nous obtenons le sel (**69**) désiré sous la forme d'une poudre très blanche (0.24 g, Rdt = 91 %).  $P_f \text{ exp} = 237\text{-}238\text{ }^{\circ}\text{C}$  (déc.);  $P_f \text{ litt} = 238\text{ }^{\circ}\text{C}$  (80); RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  7.53 (s, 4H, **H** Ar CH<sub>2</sub>-Ph-CH<sub>2</sub>), 7.51-7.45 (m, 10H, **H** Ar Ph), 4.24 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-Ph-CH<sub>2</sub>), 4.23 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-Ph).

## **Dipicrate du 1,4-Bis-(*N*-benzylaminométhyl)-benzène**

### **DA•2Pic (90)**

Nous dissolvons la diamine (**82**) (0.14 g, 0.44 mmol) dans du méthanol (2 mL) et ajoutons de l'acide picrique recristallisé (0.20 g, 0.88 mmol). Nous amenons à 0 °C jusqu'à formation d'un précipité. Celui-ci est filtré, lavé au méthanol et au toluène puis, séché. Nous obtenons le sel (**90**) désiré sous la forme d'une poudre jaune intense (0.11 g, Rdt = 34 %).  $P_f \text{ exp} > 190\text{ }^{\circ}\text{C}$  (déc.); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>):  $\delta$  9.20 (s, 4H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 8.59 (s, 4H, **H** Ar Picrate), 7.55 (s, 4H, **H** Ar CH<sub>2</sub>-Ph-CH<sub>2</sub>), 7.49-7.45 (m, 10H, **H** Ar Ph), 4.22 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-Ph-CH<sub>2</sub>), 4.17 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-Ph).

## Dipicrate de la 1,6-Hexanediamine

### Hex•2Pic (91)

Nous dissolvons de la 1,6-hexanediamine (0.10 g, 0.86 mmol) dans du méthanol (2 mL) et ajoutons de l'acide picrique recristallisé (0.36 g, 1.76 mmol). Nous observons immédiatement la formation d'un précipité. Celui-ci est filtré, lavé au méthanol et au toluène puis, séché. Nous obtenons le sel (91) désiré sous la forme d'une poudre jaune très intense (0.38 g, Rdt = 84 %).  $P_f \text{ exp} > 215^\circ\text{C}$  (déc.); RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ ):  $\delta$  8.59 (s, 4H, **H** Ar Picrate), 7.60 (s, 6H,  $\text{NH}_3^+$ ), 2.80-2.73 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 1.59-1.42 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{N}$ ), 1.35-1.22 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{N}$ ).

### 1-(*p*-Cyanophényl)-3-Phényl-2-Azapropène (84)

Dans un montage de Dean-Stark, nous dissolvons du *p*-cyanobenzaldéhyde (5.0 g, 38.1 mmol) dans du benzène (150 mL). Nous ajoutons de la benzylamine distillée (4.1 g, 38.2 mmol) et portons à reflux pendant 10 h. A la fin, nous évaporons le benzène et obtenons le composé désiré (84) sous la forme d'une gomme brune (8.4 g, Rdt = 100 %). CCM: (D)  $R_f = 0.48$ ; SM (FAB):  $m/z$  220 =  $\text{M}^+$ ; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.41 (s, 1H,  $\text{CH}=\text{N}$ ), 7.89 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, *m*-**H** Ar *p*-CN-Ph), 7.71 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, *o*-**H** Ar *p*-CN-Ph), 7.45-7.28 (m, 5H, **H** Ar Ph), 4.88 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  159.9, 140.0, 138.5, 132.4, 128.7, 128.6, 128.0, 127.3, 118.5, 114.0, 65.1.

### ***N*-Benzyl-*p*-xylylènediamine (85)**

Nous dissolvons l'imine **(84)** (5.2 g, 23.6 mmol) dans du THF anhydre (50 mL). Nous additionnons cette solution à la goutte, sous atmosphère inerte, dans du complexe borane-THF 1 M (100 mL, 100 mmol). La solution obtenue est chauffée à reflux pendant 18 h. Nous amenons alors la solution à 0 °C et ajoutons lentement de l'HCl 6 N (100 mL). Nous évaporons le THF sous vide puis, portons la suspension résultante à reflux pendant 2 h. A la fin, nous amenons le mélange à 0 °C puis, additionnons précautionneusement de la NaOH (60 g, 1.5 mol). Nous extrayons à l'éther (3 x 250 mL) et séchons la phase organique sur MgSO<sub>4</sub> anhydre. Le solvant est évaporé sous vide et nous obtenons une huile jaune. Celle-ci est purifiée par chromatographie-éclair sur colonne (gel de silice prétraité à la triéthylamine, gradient de méthanol dans le DCM 5-25 %) pour donner le composé **(85)** désiré sous la forme d'une huile limpide jaune clair (3.3 g, Rdt = 62 %). CCM: (B, plaque prétraitée) R<sub>f</sub> = 0.28; SM (FAB): *m/z* 226 = M<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.40-7.27 (m, 9H, **H** Ar), 3.86 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3.80 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-NH); RMN <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 128.4, 128.2, 127.2, 127.1, 127.0, 53.1, 52.8, 46.2. Les C aromatiques trisubstitués ne sont pas visibles.

### **1-(*p*-Cyanophényl)-3-[*p*-(*N*-benzylaminométhyl)-phényl]-2-azapropène (86)**

Dans un montage de Dean-Stark, nous dissolvons la diamine **(85)** (3.25 g, 14.4 mmol) dans du benzène (150 mL). Nous ajoutons du *p*-cyanobenzaldéhyde (1.89 g, 14.4 mmol) et portons à reflux pendant 10 h. A la

fin, nous évaporons le benzène et obtenons le composé **(86)** désiré sous la forme d'une gomme jaune intense (4.89 g, Rdt = 100 %). CCM: (B, plaque prétraitee)  $R_f = 0.93$ ; SM (FAB):  $m/z$  339 =  $M^+$ ; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.41 (s, 1H,  $CH=N$ ), 7.88 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $m-H$  Ar  $p-CN-Ph$ ), 7.70 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $o-H$  Ar  $p-CN-Ph$ ), 7.42-7.19 (m, 9H,  $H$  Ar Ph), 4.88 (s, 2H,  $CH_2-N=CH$ ), 3.82 (s, 4H,  $CH_2-NH$ ); RMN  $^{13}C$  (50 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  159.9, 140.2, 140.0, 139.4, 137.2, 132.4, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 127.0, 118.5, 114.0, 64.9, 53.1, 52.8.

#### ***N*-(*p*-Aminométhylbenzyl)-*N'*-benzyl-*p*-xylylènediamine **(87)****

Nous dissolvons l'imine **(86)** (4.70 g, 13.8 mmol) dans du THF anhydre (50 mL). Nous additionnons cette solution à la goutte, sous atmosphère inerte, dans du complexe borane-THF 1 M (60 mL, 60 mmol). La solution obtenue est chauffée à reflux pendant 18 h. Nous amenons alors la solution à 0 °C et ajoutons lentement de l'HCl 6 N (100 mL). Nous évaporons le THF sous vide puis, portons la suspension résultante à reflux pendant 2 h. A la fin, nous amenons le mélange à 0 °C puis, additionnons précautionneusement de la NaOH (36 g, 900 mmol). Nous extrayons à l'éther (3 x 100 mL) et séchons la phase organique sur  $MgSO_4$  anhydre. Le solvant est évaporé sous vide et nous obtenons une huile jaune clair. Celle-ci est purifiée par chromatographie-éclair sur colonne (gel de silice prétraité à la triéthylamine, gradient de méthanol dans le DCM 10-25 %) pour donner le composé **(87)** désiré sous la forme d'une huile limpide jaune pâle (3.25 g, Rdt = 68 %). CCM: (B, plaque prétraitee)  $R_f = 0.08$ ; SM (FAB):  $m/z$  345 =  $M^+$ ; RMN  $^1H$  (200 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.38-7.29 (m, 13H,  $H$  Ar), 3.87 (s, 2H,  $CH_2-NH_2$ ), 3.82-3.79 (m, 8H,  $CH_2-$



NH); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  141.9, 140.2, 138.9, 138.8, 128.3, 128.1, 128.0, 127.0, 126.8, 53.0, 52.8, 52.7, 46.1.

***N*-[*p*-(*p*-(*p*-Benzylaminométhyl)-benzylaminométhyl)-benzylaminométhyl]-benzylimine (88)**

Dans un montage de Dean-Stark, nous dissolvons la triamine (**87**) (3.00 g, 8.7 mmol) dans du benzène (100 mL). Nous ajoutons du benzaldéhyde distillé (0.89 mL, 8.7 mmol) et portons à reflux pendant 10 h. A la fin, nous évaporons le benzène et obtenons le composé (**88**) désiré sous la forme d'une gomme jaune (3.77 g, Rdt = 100 %). CCM: (B, plaque prétraitée)  $R_f$  = 0.92; SM (FAB):  $m/z$  433 =  $M^+$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.40 (s, 1H, CH=N), 7.81-7.78 (m, 2H, *o*-H Ar *p*-N=CH-Ph), 7.44-7.42 (m, 3H, 2 *m*-H et *p*-H *p*-N=CH-Ph), 7.37-7.27 (m, 13H, H Ar Ph), 4.83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-N=CH), 3.82-3.80 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-NH); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  161.8, 140.2, 138.9, 137.9, 136.1, 130.6, 129.6, 128.5, 128.3, 128.2, 128.2, 128.1, 128.1, 128.0, 126.8, 64.7, 53.0, 52.8, 52.7, 52.7.

**Bis-(*p*-benzylaminométhyl)-dibenzylamine (89)**

Nous dissolvons l'imine (**88**) (3.50 g, 8.1 mmol) dans du méthanol (100 mL). Nous ajoutons peu à peu à cette solution du borohydrure de sodium (1.23 g, 32.4 mmol). Dès que le dégagement d'hydrogène a cessé, nous portons la solution à reflux pendant 18 h. Ensuite, nous l'amenons à 0 °C et additionnons lentement de l'HCl 2 N, jusqu'à obtention d'un pH = 2-3. Nous

é vaporons le méthanol sous vide puis, amenons le mélange à 0 °C. Nous additionnons de la NaOH en pastilles jusqu'à dissolution du précipité laiteux. Nous extrayons alors à l'éther (3 x 100 mL) et séchons la phase organique sur MgSO<sub>4</sub> anhydre. Le solvant est évaporé sous vide et nous obtenons le produit **(89)** désiré sous la forme d'une huile incolore limpide (3.24 g, Rdt = 92 %). CCM: (B, plaque prétraî tée) R<sub>f</sub> = 0.89; SM (FAB): *m/z* 435 = M<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.36-7.26 (m, 18H, **H** Ar), 3.82-3.81 (m, 12H, **CH**<sub>2</sub>), 1.67 (s, 3H, **NH**); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 140.3, 138.9, 128.7, 128.3, 128.1, 128.0, 126.8, 53.1, 52.8.

### **Tri-hexafluorophosphorhydrate de la Bis-(*p*-benzylaminométhyl)-dibenzylamine**

#### **TA•3PF<sub>6</sub> (70)**

Nous dissolvons l'amine **(89)** (0.11 g, 0.25 mmol) dans du méthanol (3 mL) et ajoutons de l'acide hexafluorophosphorique 60 % en excès (0.25 mL). Nous évaporons le méthanol sous vide, reprenons le résidu par de l'eau très froide et filtrons. Le composé est lavé à l'eau froide puis, longuement séché. Nous obtenons le sel **(70)** désiré sous la forme d'une poudre très blanche (0.22 g, Rdt = 99 %). P<sub>f</sub> exp = 259-260 °C (déc.); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 7.56 (s, 8H, **H** Ar CH<sub>2</sub>-Ph-CH<sub>2</sub>), 7.50 (s, 10H, **H** Ar CH<sub>2</sub>-Ph), 7.25 (s, 6H, **NH**<sub>2</sub>), 7.34-7.24 (m, 12H, **CH**<sub>2</sub>).

## 2.2 SYNTHÈSES EN PHASE SOLIDE

La synthèse en phase solide concerne exclusivement les peptides. Nous décrivons tout d'abord l'approche générale, qui se décompose en trois parties:

- la synthèse d'un segment peptidique
- le clivage
- et, éventuellement, la condensation de ce segment.

Toute modification apportée à cette approche, pour la synthèse d'un peptide particulier, sera spécifiée.

### 2.2.1 Synthèse peptidique en phase solide (SPPS)

#### 2.2.1.1. Fixation du premier acide aminé

Nous introduisons la résine oxime (**20**) (5 g), possédant un taux de substitution théorique de 0.4 mmol/g, dans une ampoule munie d'un verre fritté à une extrémité et d'un bouchon en téflon. La résine est gonflée au DCM (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). Nous dissolvons de la BOC-Leu.H<sub>2</sub>O (4.99 g, 20 mmol, 10 éq) dans un mélange DCM-DMF 1:1 (80 mL) et amenons la solution à 0 °C. Nous additionnons du DIC (3.13 mL, 20 mmol) et agitons pendant 20 min. La suspension est versée dans l'ampoule et nous mettons sous agitation mécanique pendant 24 h. A la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion.

#### 2.2.1.2 Séquence de lavages

La résine est agitée successivement en présence des solvants suivants: DMF (3 x 100 mL); méthanol (3 x 100 mL); DMF (3 x 100 mL); méthanol (3 x 100 mL). Puis elle est séchée exhaustivement sous vide poussé.

#### 2.2.1.3. Détermination du taux de substitution

Cette étape n'a été réalisée qu'à trois reprises vu que la résine utilisée provient toujours du même stock et que les résultats observés semblent beaucoup sous-estimer la réalité.

Nous utilisons le test quantitatif de Kaiser à la ninhydrine (40) et déterminons un taux de substitution variant entre 0.35 et 0.40 mmol/g de résine sèche.

#### 2.2.1.4. Acétylation des sites non-substitués

La résine est gonflée au DMF (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). Nous introduisons dans l'ampoule un mélange anhydride acétique-DMF 1:1 (80 mL) et de la DIEA (1.00 mL, 5.75 mmol). Nous mettons sous agitation mécanique pendant 2 h. A la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion.

#### 2.2.1.5. Séquence de lavages

Cette étape est identique à l'étape 2.2.1.2

#### 2.2.1.6. Benzoylation des sites non-substitués (facultatif)

La résine est gonflée au dioxane (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). Nous introduisons dans l'ampoule un mélange DMF-chlorure de benzoyle 4:1 (80 mL) et de la DIEA (1.00 mL, 5.75 mmol). Nous mettons sous agitation mécanique pendant 1 h. A la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion.

#### 7. Séquence de lavages

Cette étape est identique à l'étape 2.2.1.2.

#### 2.2.1.8. Déprotection de la fonction amine du dernier acide aminé fixé

La résine est gonflée au DCM (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). Nous introduisons dans l'ampoule un mélange acide trifluoroacétique-DMF 1:1 (80 mL) et mettons sous agitation mécanique pendant 30 min. A la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion.

#### 2.2.1.9. Séquence de lavages

Cette étape est identique à l'étape 2.2.1.2.

#### 2.2.1.10. Couplage de l'acide aminé suivant

La résine est gonflée au DMF (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). Nous dissolvons le BOC-aminoacide (20 mmol, 10 éq ou 6 mmol, 3 éq, dans le cas des composés **(14)** et **(19)**) dans un mélange DCM-DMF 1:1 (80 mL) et amenons la solution à 0 °C. Nous additionnons du DIC (3.13 mL, 20 mmol ou 0.94 mL, 6 mmol, dans le cas des composés **(14)** et **(19)**) et agitons pendant 10 min. Puis, nous ajoutons de l'HOBt.H<sub>2</sub>O (2.70 g, 20 mmol ou 0.81 g, 6 mmol, dans le cas des composés **(14)** et **(19)**) et agitons pendant 20 min supplémentaires. Nous introduisons la suspension dans l'ampoule, ajoutons de la DIEA (0.70 mL, 2 éq) et mettons sous agitation mécanique pendant 3 h. A la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion.

#### 2.2.1.11. Séquence de lavages

Cette étape est identique à l'étape 2.2.1.2.

#### 2.2.1.12. Détermination de l'efficacité du couplage

Nous utilisons le test qualitatif de Kaiser à la ninhydrine (40). Pour les cas où le test est négatif, nous reprenons à l'étape 10.

Les étapes 2.2.1.8 à 2.2.1.12 sont effectuées n-1 fois pour un peptide de n acides aminés.

### 2.2.2. Clivage et clivage final du peptide

Une des trois méthodes générales de clivage sera utilisée, à moins spécification contraire. S'il s'agit d'un *clivage final*, nous clivons la totalité de peptide fixé sur la résine; et seulement les 3/4 dans le cas de la préparation d'un peptide acide en vue de la condensation de segments en phase solide. Dans ce dernier cas, il sera simplement nommé *clivage*.

Les volumes de solvants ne sont donnés qu'à titre indicatif pour l'équivalent de 3.75 g de résine sèche et varient en fonction de la quantité de résine mise en oeuvre. Les équivalents s'entendent par rapport à la quantité de peptide fixé sur la résine, estimée par mesure du taux de substitution.

#### 2.2.2.1. Amide *n*-propylique du peptide BOC-protégé

##### **BOC-Peptide-NH-*n*-Pr**

La résine est gonflée au DCM puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). Nous introduisons dans l'ampoule un mélange DCM-*n*-propylamine 9:1 (80 mL) et mettons sous agitation mécanique pendant 30 min. A la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion. La résine est lavée plusieurs fois au DCM et au méthanol. Le filtrat est récupéré et les solvants sont évaporés sous vide.

#### 2.2.2.2. Peptide BOC-protégé acide (42)

##### **BOC-Peptide-OH**

La résine est gonflée au THF (100 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 100 mL). Nous introduisons dans l'ampoule un mélange THF-eau 9:1 (80 mL) et du bromure de lithium (5 éq). Nous agitons mécaniquement pendant 15 min. Puis, nous ajoutons du DBU (2 éq) dans l'ampoule et mettons sous agitation mécanique pendant 4 h. A la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion. La résine est lavée plusieurs fois au DCM et au méthanol. Le filtrat est récupéré et les solvants sont évaporés sous vide. Le résidu est repris par du DCM (50 mL) puis, lavé par HCl 0.5 N (2 x 50 mL) et à la saumure (50 mL). La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre et le solvant est évaporé sous vide.

#### 2.2.2.3. Ester méthylique du peptide BOC-protégé (42)

##### **BOC-Peptide-OMe**

La résine est lavée au méthanol (3 x 100 mL) puis, mise en suspension dans ce même solvant (80 mL). Nous introduisons dans l'ampoule du bromure de lithium anhydre (5 éq) et agitons mécaniquement pendant 15 min. Nous ajoutons du DBU (2 éq) dans l'ampoule et mettons sous agitation mécanique pendant 4 h. A la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion. La résine est lavée plusieurs fois au DCM et au méthanol. Le filtrat est récupéré et les solvants sont évaporés sous vide. Le résidu est repris par du DCM (50 mL)



puis, lavé par HCl 0.5 N (2 x 50 mL) et à la saumure (50 mL). La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  anhydre et le solvant est évaporé sous vide.

### 2.2.3. Condensation de segments en phase solide (CSPS) (44,45)

Le dernier 1/4 de résine contenant le peptide non-clivé sert de support solide lors de la condensation de segments. Ceci est la stratégie générale utilisée pour la condensation de deux segments.

Nous déposons la résine (1 g) supportant le fragment peptidique dans un tube en polystyrène de 5 mL, muni d'un petit fritté et d'un bouchon aux deux extrémités (tube ISOLAB®). La résine est gonflée au DCM (3 mL) puis, lavée avec ce même solvant (2 x 3 mL). Nous introduisons dans le tube un mélange acide trifluoroacétique-DCM 1:1 (3 mL) et mettons sous agitation mécanique pendant 40 min. La résine est alors filtrée, lavée (*cf.* étape 2.2.1.2, 3 mL de chaque solvant) et séchée. Nous dissolvons le BOC-Peptide-OH (0.39 mmol, 2 éq), précédemment clivé, dans du DMF (3 mL) et amenons la solution à 0 °C. Nous additionnons du DIC (61  $\mu\text{L}$ , 0.39 mmol) et agitons pendant 15 min. Puis, nous ajoutons de l'HOBt. $\text{H}_2\text{O}$  (53 mg, 0.39 mmol) et agitons pendant 40 min supplémentaires. La résine est gonflée au DMF (3 mL) et lavée avec ce même solvant (2 x 3 mL). Nous introduisons alors la solution de peptide activé dans le tube, ajoutons de la DIEA (70  $\mu\text{L}$ , 2 éq) et mettons sous agitation mécanique, à 4 °C, pendant 20 h. A la fin, le contenu de l'ampoule est filtré par succion et la résine est lavée comme ci-dessus.

Ce protocole est répété pour chaque segment supplémentaire à coupler. Entre deux étapes de condensation, nous acétylons les segments déprotégés qui n'ont pas couplé comme suit: la résine, gonflée et lavée au DMF (3 x 3mL), est traitée par un mélange anhydride acétique-DMF 1:1 (3 mL) et de la DIEA (80  $\mu$ L) pendant 2 h, sous agitation mécanique. A la fin, elle est lavée selon le protocole 2.2.1.2, en utilisant 3 mL de chaque solvant puis, séchée.

**(*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu-OH (21)**

**SPPS:** Le peptide est synthétisé selon la stratégie générale, en utilisant de la BOC-Leu.H<sub>2</sub>O et du BOC-ECV-OH (**14**). **Clivage:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.2 de la méthode générale. Nous triturons le résidu à l'éther anhydre pour obtenir le peptide (**21**) désiré sous la forme d'une fine poudre blanche (*m* = 1.42 g). La pureté est mesurée par HPLC et estimée supérieure à 90 %. Le produit sera utilisé tel quel pour la suite des synthèses. HPLC antl: (A) *R*<sub>t</sub> = 18.6 min; SM (FAB): *m/z* 1535 = (*M* + *H*)<sup>+</sup>, 1557 = (*M* + Na)<sup>+</sup>, 1573 = (*M* + K)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>):  $\delta$  8.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 8.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NH), 7.98 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 7.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 7.72 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, NH), 7.65 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, NH), 6.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, NH-BOC), 6.77-6.63 (m, 6H, H Ar), 4.50-4.48 (m, 2H, C $\alpha$ H ECV), 4.33-4.20 (m, 4H, C $\alpha$ H Leu), 4.10-3.90 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-OPh), 3.84 (m, 1H, C $\alpha$ H BOC-Leu), 3.79-3.65 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OPh), 3.64-3.44

(m, 32H, CH<sub>2</sub>-O), 3.00-2.59 (m, 4H, CβH<sub>2</sub> ECV), 1.63-1.22 (m, 24H, 5 CβH<sub>2</sub> Leu + 5 CγH Leu + 9 H *t*-Bu), 0.88-0.75 (m, 30H, CH<sub>3</sub> Leu).

**Ester méthylique de la (*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu-OMe (24)**

**SPPS:** Elle est identique à celle du composé (21). **Clivage final:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.3 de la méthode générale, en utilisant 300 mg de résine. Nous dissolvons le résidu dans l'acide acétique et le lyophilisons pour obtenir le peptide (24) désiré sous la forme de flocons blancs (m = 80 mg). HPLC antl: (A) R<sub>t</sub> = 27.5 min; SM (FAB): *m/z* 1548 = (M + H)<sup>+</sup>, 1586 = (M + K)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): δ 8.31-7.62 (m, 6H, NH), 6.97 (m, 1H, NH-BOC), 6.80-6.63 (m, 6H, H Ar), 4.55-4.47 (m, 2H, CαH ECV), 4.33-4.20 (m, 4H, CαH Leu), 4.10-3.90 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-OPh), 3.84 (m, 1H, CαH BOC-Leu), 3.79-3.65 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OPh), 3.64-3.44 (m, 35H, 16 CH<sub>2</sub>-O + CH<sub>3</sub>-O), 3.00-2.59 (m, 4H, CβH<sub>2</sub> ECV), 1.63-1.22 (m, 24H, 5 CβH<sub>2</sub> Leu + 5 CγH Leu + 9 H *t*-Bu), 0.88-0.75 (m, 30H, CH<sub>3</sub> Leu).

**Ester méthylique de la (*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>7</sub>-OMe (32)**

**SPPS et clivage:** Ils sont identiques à ceux du composé **(21)**. **CSPS:** Nous effectuons le protocole général 2.2.3, avec le segment BOC-Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu-OH **(21)**. **Clivage final:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.3 de la méthode générale, sur 350 mg de résine. Nous purifions le résidu gommeux jaune (m = 200 mg) par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants, nous obtenons le peptide **(32)** désiré, par lyophilisation dans l'acide acétique, sous la forme de flocons blancs (m = 76 mg). HPLC anlt: (B) R<sub>t</sub> = 17.3 min; SM (FAB): *m/z* 2988 = (M + Na)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.20-7.30 (m, 13H, NH), 6.85-6.50 (m, 12H, H Ar), 4.50 (m, 4H, CαH ECV), 4.25-3.95 (m, 26H, 8 CH<sub>2</sub>-OPh + 10 CαH Leu), 3.95-3.50 (m, 83H, 40 CH<sub>2</sub>-O + CH<sub>3</sub>-O), 3.35-3.00 (m, 8H, CβH<sub>2</sub> ECV), 2.05-1.35 (m, 39H, 10 CβH<sub>2</sub> Leu + 10 CγH Leu + 9 H *t*-Bu), 1.05-0.70 (m, 60H, CH<sub>3</sub> Leu).

**Ester méthylique de la (*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-OMe (29)**

**SPPS et clivage:** Ils sont identiques à ceux du composé **(21)**. **CSPS:** Nous effectuons deux cycles du protocole général 2.2.3, avec le segment BOC-Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu-OH **(21)**. **Clivage final:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.3 de la méthode générale. Nous obtenons un résidu solide jaune (m = 1.12 g), dont nous purifions 100 mg par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants, nous obtenons le peptide **(29)** désiré, par lyophilisation dans l'acide acétique, sous la forme de flocons jaunes (m = 28 mg). HPLC anlt: (C) R<sub>t</sub> = 22.8 min; SM (FAB):  $m/z$  4406 = (M + Na)<sup>+</sup>, (ES):  $m/z$  1113.5 = (M + 4 NH<sub>4</sub>)<sup>4+</sup>, 1479 = (M + 3 NH<sub>4</sub>)<sup>3+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): δ 8.30-7.40 (m, 21H, NH), 6.85-6.60 (m, 18H, H Ar), 4.35-4.25 (m, 6H, CαH ECV), 4.10-3.85 (m, 24H, CH<sub>2</sub>-OPh), 3.75-3.60 (m, 24H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OPh), 3.60-3.40 (m, 114H, 48 CH<sub>2</sub>-O + 15 CαH Leu + CH<sub>3</sub>-O), 3.10-2.90 (m, 12H, CβH<sub>2</sub> ECV), 1.65-1.35 (m, 54H, 15 CβH<sub>2</sub> Leu + 15 CγH Leu + 9 H *t*-Bu), 0.95-0.65 (m, 90H, CH<sub>3</sub> Leu).

**(*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-L-phénylalanyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-phénylalanyl-L-leucine**

**BOC-Leu-Phé-Leu<sub>3</sub>-Phé-Leu-OH (23)**

**SPPS:** Le peptide est synthétisé selon la stratégie générale, en utilisant de la BOC-Leu.H<sub>2</sub>O et du BOC-Phé. **Clivage:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.2 de la méthode générale. Nous obtenons le peptide **(23)** désiré sous la forme d'un solide amorphe. Nous triturons celui-ci à l'éther anhydre pendant 7 h pour obtenir une fine poudre blanche (m = 950 mg). La pureté est mesurée par HPLC et estimée supérieure à 75 %. Le produit sera utilisé tel

**Ester méthylique de la (N-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-L-phénylalanyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-phénylalanyl-L-leucyl-L-leucyl-L-phénylalanyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-phénylalanyl-L-leucyl-L-leucyl-L-phénylalanyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-phénylalanyl-L-leucine**

**SPPS et clivage:** Ils sont identiques à ceux du composé **(23)**. **CSPS:** Nous effectuons le protocole général 2.2.3, avec le segment BOC-Leu-Phé-Leu<sub>3</sub>-Phé-Leu-OH **(23)** (350 mg, 0.35 mmol, 1.5 éq) et 850 mg de résine. Le solvant utilisé est le mélange DMF-DMSO 1:1 (10 ml). **Clivage final:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.3 de la méthode générale. Nous obtenons un solide blanc (m = 440 mg), dont nous purifions 100 mg par HPLC semi-préparative. Après lyophilisation dans l'acide acétique, nous obtenons le peptide **(31)** désiré sous la forme de flocons blancs (m = 19 mg). HPLC antl: (C) R<sub>t</sub> = 28.0 min; SM (FAB): *m/z* 2735 = (M + Na)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.40-7.55 (m, 20H, NH), 7.20-6.90 (m, 30H, H Ar), 4.20-3.90 (m,

21H, 15 C $\alpha$ H Leu + 6 C $\alpha$ H Phé), 3.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.20-2.95 (m, 12H, C $\beta$ H<sub>2</sub> Phé), 2.0-1.35 (m, 54H, 15 C $\beta$ H<sub>2</sub> Leu + 15 C $\gamma$ H Leu + 9 H *t*-Bu), 1.05-0.60 (m, 90H, CH<sub>3</sub> Leu).

**L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucine**

**H-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-OH (33)**

**SPPS, clivage et CSPA:** Les trois étapes sont identiques à celles du composé (29). A la fin, nous gonflons 125 mg de la résine obtenue au DCM (2 mL) et la lavons avec ce même solvant (2 x 2mL). La résine est ensuite traitée par le mélange acide trifluoroacétique-DCM 1:1 (3 mL) pendant 40 min, lavée selon le protocole 2.2.1.2 (avec 2 mL de chaque solvant) puis séchée. **Clivage final:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.2 de la méthode générale, sur 125 mg de résine. Nous obtenons une mousse jaune (m = 47 mg), que nous purifions par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants, nous obtenons le peptide (33) désiré, par lyophilisation dans l'acide acétique, sous la forme de flocons blancs (m = 13 mg). HPLC antl: (C) R<sub>t</sub> = 19.9 min; SM (ES): *m/z* 1081 = (M + H + 3 NH<sub>4</sub>)<sup>4+</sup>, 1441 = (M + 3 NH<sub>4</sub>)<sup>3+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Le spectre contient peu d'informations en raison

de la faible quantité de produit et de la nécessité d'utiliser du chloroforme afin de pouvoir le recycler. Globalement, nous observons:  $\delta$  8.20-7.90 (m, NH), 6.90-6.35 (m, H Ar), 4.40-3.30 (m, C $\alpha$ H ECV + C $\alpha$ H Leu + CH<sub>2</sub> couronnes), 3.10-2.90 (m, C $\beta$ H<sub>2</sub> ECV), 1.95-1.15 (m, C $\beta$ H<sub>2</sub> Leu + C $\gamma$ H Leu), 1.00-0.60 (m, CH<sub>3</sub> Leu).

**Amide 2-aminoéthylrique de la L-Leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucine**

**H-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-EDA (34)**

**SPPS, clivage et CSPS:** Les trois étapes sont identiques à celles du composé (33). **Clivage final:** La résine est gonflée au THF (3 mL) puis lavée à l'aide de ce solvant (2 x 3 mL). Nous la mettons en suspension dans le THF (2 mL) et ajoutons de l'éthylènediamine distillée (20  $\mu$ L, 0.23 mmol, 5 éq). Nous mettons sous agitation mécanique pendant 4 h. A la fin, la solution est filtrée et la résine lavée plusieurs fois au DCM et au méthanol. Nous évaporons les solvants pour obtenir un résidu ambré. Celui-ci est purifié par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants, nous obtenons le peptide (34) désiré, par lyophilisation dans l'acide acétique, sous la forme de flocons blancs (m = 25 mg). HPLC anlt: (F) R<sub>t</sub> = 33.8 min; SM (ES):  $m/z$  1087 = (M + 2 H +



$2 \text{ NH}_4^{4+}$ , 873 =  $(\text{M} + 2 \text{ H} + 3 \text{ NH}_4)^{5+}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Cas identique à (33).

**Ester 2,3-dihydroxypropylique de la L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucine**

**H-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-Gly (35)**

**SPPS, clivage et CSPA:** Les trois étapes sont identiques à celles du composé (33). **Clivage final:** La résine est gonflée au DMF (3 mL) puis lavée à l'aide de ce solvant (2 x 3 mL). Nous la mettons en suspension dans un mélange DMF-glycérol 9:1 (2 mL) et ajoutons du bromure de lithium anhydre (20 mg, 0.24 mmol, 5 éq) puis du DBU (20  $\mu\text{L}$ , 0.09 mmol, 2 éq). Nous mettons sous agitation mécanique pendant 4 h. A la fin, la solution est filtrée et la résine lavée plusieurs fois au DCM et au méthanol. Le filtrat est concentré par évaporation sous vide puis directement purifié par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants, nous obtenons le peptide (35) désiré, par lyophilisation dans l'acide acétique, sous la forme de flocons blancs ( $m = 17 \text{ mg}$ ). HPLC anlt: (E)  $R_t = 20.7 \text{ min}$ ; SM (ES):  $m/z$  1099 =  $(\text{M} + 1 \text{ H} + 3 \text{ NH}_4)^{4+}$ , 883 =  $(\text{M} + 1 \text{ H} + 4 \text{ NH}_4)^{5+}$ , 1460 =  $(\text{M} + 1 \text{ H} + 2 \text{ NH}_4)^{3+}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Cas identique à (33).

**(N-2,4,5-Tricarboxyphénylcarbonyl-L-leucyl)-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(21-couronne-7)-phényl)-L-alanyl]-L-leucine**

**Pyr-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-OH (36)**

**SPPS, clivage et CSPA:** Les trois étapes sont identiques à celles du composé **(33)**, mais effectuées sur 200 mg de résine. Puis, la résine est gonflée au DMF (3 mL) et lavée à l'aide de ce solvant (2 x 3 mL). Nous la mettons en suspension dans du DMF (2 mL) et ajoutons de l'anhydride pyromellitique (400 mg, 1.57 mmol, 20 éq) ainsi que de la DIEA (30 µL, 0.18 mmol, 2 éq). Nous mettons sous agitation mécanique pendant 4 h. A la fin, la résine est lavée selon le protocole 2.2.1.2 (avec 2 mL de chaque solvant) puis séchée.

**Clivage final:** Il est identique à celui du composé **(33)**, mais avec 5 éq de DBU. A la fin, la solution est filtrée et la résine lavée plusieurs fois au DCM et au méthanol. Le filtrat est concentré par évaporation sous vide puis directement purifié par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants, nous obtenons le peptide **(36)** désiré sous la forme de flocons blancs par lyophilisation dans l'acide acétique (*m* = 16 mg). HPLC anlt: (C) *R<sub>t</sub>* = 24.1 min; SM (FAB): *m/z* 4529 = (*M* + Na)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Cas identique à **(33)**.

**Ester méthylique de la (*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(3,4-(15-couronne-5)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(15-couronne-5)-phényl)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-Leu-ECQ-Leu<sub>3</sub>-ECQ-Leu-OMe (25)**

**SPPS:** Le peptide est synthétisé selon la stratégie générale, en utilisant de la BOC-Leu.H<sub>2</sub>O et du BOC-ECQ-OH (19). **Clivage:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.3 de la méthode générale. Nous triturons le résidu à l'éther anhydre pour obtenir le peptide (25) désiré sous la forme d'une fine poudre blanche (m = 1.15 g). La pureté est évaluée par HPLC et estimée supérieure à 60 %. Le produit sera utilisé tel quel pour la suite des synthèses. HPLC anlt: (A) R<sub>t</sub> = 22.8 min; SM (ES): *m/z* 1373 = (M + H)<sup>+</sup>, 1390 = (M + NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, 1411 = (M + K)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): δ 8.31-8.25 (m, 2H, NH), 8.08 (m, 1H, NH), 7.99 (m, 1H, NH), 7.82 (m, 1H, NH), 7.68 (m, 1H, NH), 6.98 (m, 1H, NH-BOC), 6.81-6.62 (m, 6H, H Ar), 4.55-4.45 (m, 2H, CαH ECQ), 4.37-4.19 (m, 4H, CαH Leu), 4.08-3.93 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-OPh), 3.83 (m, 1H, CαH BOC-Leu), 3.77-3.68 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OPh), 3.62-3.48 (m, 19H, 8 CH<sub>2</sub>-O + CH<sub>3</sub>-O), 2.96-2.65 (m, 4H, CβH<sub>2</sub> ECQ), 1.62-1.18 (m, 24H, 5 CβH<sub>2</sub> Leu + 5 CγH Leu + 9 H *t*-Bu), 0.91-0.72 (m, 30H, CH<sub>3</sub> Leu).

**(*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(3,4-(15-couronne-5)-phényl)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(3,4-(15-couronne-5)-phényl)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-Leu-ECQ-Leu<sub>3</sub>-ECQ-Leu-OH (22)**



### BOC-(Leu-ECQ-Leu<sub>3</sub>-ECQ-Leu)<sub>3</sub>-OMe (30)

**SPPS et clivage:** Ils sont identiques à ceux du composé (22). **CSPS:** Nous effectuons deux cycles du protocole général 2.2.3, avec le segment BOC-Leu-ECQ-Leu<sub>3</sub>-ECQ-Leu-OH (22) (131 mg, 0.30 mmol, 2 éq) et 500 mg de résine. **Clivage final:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.3 de la méthode générale, sur 100 mg de résine. Nous obtenons une gomme jaune que nous purifions par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants, nous obtenons le peptide (30) désiré, par lyophilisation dans l'acide acétique, sous la forme de flocons jaunes (m = 22 mg). HPLC anlt: (H) R<sub>t</sub> = 25.2 min; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.40-7.60 (m, 20H, NH), 6.95-6.60 (m, 18H, H Ar), 4.50-3.95 (m, 30H, 6 CαH ECQ + 12 CH<sub>2</sub>-OPh), 3.95-3.40 (m, 90H, 36 CH<sub>2</sub>-O + 15 CαH Leu + CH<sub>3</sub>-O), 3.10-2.90 (m, 12H, CβH<sub>2</sub> ECQ), 1.95-1.35 (m, 54H, 15 CβH<sub>2</sub> Leu + 15 CγH Leu + 9 H *t*-Bu), 1.05-0.65 (m, 90H, CH<sub>3</sub> Leu).

**Amide *n*-propylique de la (*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucine**

### BOC-Leu-BEC-Leu<sub>3</sub>-BEC-Leu-NH-*n*-Pr (63)

**SPPS:** Le peptide est synthétisé selon la stratégie générale, en utilisant de la BOC-Leu.H<sub>2</sub>O, du BOC-BEC-OH (74) et 2.5 g de résine oxime (20). **Clivage final:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.1 de la méthode générale. Nous triturons le résidu à l'éther anhydre pour obtenir une fine

poudre beige ( $m = 1.93$  g). La pureté est mesurée par HPLC et estimée supérieure à 75 %. Une fraction (80 mg) de ce brut est purifiée par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants et lyophilisation dans l'acide acétique, nous obtenons le peptide **(63)** désiré sous la forme de flocons blancs ( $m = 41$  mg). HPLC anlt: (H)  $R_t = 17.9$  min; SM (ES):  $m/z$  898 =  $(M + 2 \text{NH}_4)^{2+}$ , 599 =  $(M + H + 2 \text{NH}_4)^{3+}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.53 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H,  $\text{NH-}n\text{-Pr}$ ), 7.35-7.29 (m, 4H,  $\text{NH Leu}$ ), 7.01 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H,  $\text{NH BEC}$ ), 6.89 (m, 10H, 8  $\text{H Ar catéchol} + \text{NH BEC} + \text{H Ar DOPA}$ ), 6.83 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H,  $\text{H Ar DOPA}$ ), 6.76 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $\text{H Ar DOPA}$ ), 6.67 (m, 3H,  $\text{H Ar DOPA}$ ), 5.02 (m, 1H,  $\text{NH-BOC}$ ), 4.50-4.42 (m, 2H,  $\text{C}\alpha\text{H BEC}$ ), 4.23-4.01 (m, 21H, 8  $\text{CH}_2\text{-OPh} + 5 \text{C}\alpha\text{H Leu}$ ), 3.93-3.69 (m, 34H, 16  $\text{CH}_2\text{-O} + \text{CH}_2\text{-N}$ ), 3.37-2.89 (m, 4H,  $\text{C}\beta\text{H}_2 \text{BEC}$ ), 1.86-1.44 (m, 17H, 5  $\text{C}\beta\text{H}_2 \text{Leu} + 5 \text{C}\gamma\text{H Leu} + \text{NCH}_2\text{-CH}_2\text{-Me}$ ), 1.41 (s, 9H,  $\text{H } t\text{-Bu}$ ), 0.98-0.83 (m, 33H, 10  $\text{CH}_3 \text{Leu} + \text{CH}_3 n\text{-Pr}$ ).

**Amide *n*-propylique de la (*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-Leu-BEC-Leu<sub>4</sub>-BEC-Leu-NH-*n*-Pr (64)**

**SPPS et clivage final:** Ils sont identiques à ceux utilisés pour le composé **(63)**. Nous triturons le résidu à l'éther anhydre pour obtenir une fine poudre beige ( $m = 2.21$  g). La pureté est mesurée par HPLC et estimée supérieure à 65 %. Une fraction (120 mg) de ce brut est purifiée par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants et lyophilisation dans l'acide

acétique, nous obtenons le peptide **(64)** désiré sous la forme de flocons blancs ( $m = 47$  mg). HPLC anlt: (H)  $R_t = 18.5$  min; SM (ES):  $m/z$  954 =  $(M + 2 \text{ NH}_4)^{2+}$ , 636.5 =  $(M + H + 2 \text{ NH}_4)^{3+}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.52 (d,  $J = 3.9$  Hz, 1H, NH-*n*-Pr), 7.48-7.32 (m, 5H, NH Leu), 7.01 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, NH BEC), 6.95-6.90 (m, 10H, 8 H Ar catéchol + NH BEC + H Ar DOPA), 6.82 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H Ar DOPA), 6.72 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H Ar DOPA), 6.68 (m, 3H, H Ar DOPA), 5.05 (m, 1H, NH-BOC), 4.51-4.47 (m, 1H, C $\alpha$ H BEC), 4.44-4.40 (m, 1H, C $\alpha$ H BEC), 4.25-4.04 (m, 22H, 8 CH $_2$ -OPh BEC + 6 C $\alpha$ H Leu), 3.93-3.70 (m, 34H, 16 CH $_2$ -O + CH $_2$ -N), 3.36-2.97 (m, 4H, C $\beta$ H $_2$  BEC), 1.96-1.43 (m, 20H, 6 C $\beta$ H $_2$  Leu + 6 C $\gamma$ H Leu + NCH $_2$ -CH $_2$ -Me), 1.40 (s, 9H, H *t*-Bu), 1.04-0.86 (m, 39H, 12 CH $_3$  Leu + CH $_3$  *n*-Pr).

**Amide *n*-propylique de la (*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-Leu-BEC-Leu $_3$ -BEC-Leu $_3$ -BEC-Leu-NH-*n*-Pr (65)**

**SPPS et clivage final:** Ils sont identiques à ceux utilisés pour le composé **(63)**. La pureté est mesurée par HPLC et estimée supérieure à 55 %. Une fraction (80 mg) du brut est purifiée par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants et lyophilisation dans l'acide acétique, nous obtenons le peptide **(65)** désiré sous la forme de flocons blancs ( $m = 21$  mg). HPLC anlt: (H)  $R_t = 27.9$  min; SM (ES):  $m/z$  1309 =  $(M + 2 \text{ H})^{2+}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (500

MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.1-7.1 (m, 11H, NH-*n*-Pr + 7 NH-Leu + 3 NH-BEC), 7.0-6.6 (m, 21H, 12 H Ar catéchol + 9 H Ar DOPA), 4.5-4.3 (m, 3H, C $\alpha$ H BEC), 4.3-3.5 (m, 82H, 36 CH<sub>2</sub>-O + 8 C $\alpha$ H Leu + CH<sub>2</sub>-N), 3.3-2.9 (m, 6H, C $\beta$ H<sub>2</sub> BEC), 2.0-1.3 (m, 35H, 8 C $\beta$ H<sub>2</sub> Leu + 8 C $\gamma$ H Leu + NCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Me + 9 H *t*-Bu), 1.1-0.7 (m, 51H, 16 CH<sub>3</sub> Leu + CH<sub>3</sub> *n*-Pr).

**Amide *n*-propylique de la (*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-Leu-BEC-Leu<sub>4</sub>-BEC-Leu<sub>4</sub>-BEC-Leu-NH-*n*-Pr (66)**

**SPPS et clivage final:** Ils sont identiques à ceux utilisés pour le composé (63). La pureté est mesurée par HPLC et estimée supérieure à 55 %. Une fraction (120 mg) du brut est purifiée par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants et lyophilisation dans l'acide acétique, nous obtenons le peptide (66) désiré sous la forme de flocons blancs (*m* = 30 mg). HPLC anlt: (H) R<sub>t</sub> = 25.7 min; SM (ES): *m/z* 1422.5 = (M + 2 H)<sup>2+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.1-7.0 (m, 13H, NH-*n*-Pr + 9 NH-Leu + 3 NH-BEC), 7.0-6.7 (m, 21H, 12 H Ar catéchol + 9 H Ar DOPA), 4.5-4.3 (m, 3H, C $\alpha$ H BEC), 4.3-3.5 (m, 84H, 36 CH<sub>2</sub>-O + 10 C $\alpha$ H Leu + CH<sub>2</sub>-N), 3.3-3.0 (m, 6H, C $\beta$ H<sub>2</sub> BEC), 2.0-1.3 (m, 41H, 10 C $\beta$ H<sub>2</sub> Leu + 10 C $\gamma$ H Leu + NCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Me + 9 H *t*-Bu), 1.1-0.7 (m, 63H, 20 CH<sub>3</sub> Leu + CH<sub>3</sub> *n*-Pr).



**Amide *n*-propylique de la (*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-isoleucyl-L-valyl-L-alanyl-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-Leu-BEC-Ile-Val-Ala-BEC-Leu-NH-*n*-Pr (67)**

**SPPS:** Le peptide est synthétisé selon la stratégie générale, en utilisant de la BOC-Leu.H<sub>2</sub>O, de la BOC-Ala, de la BOC-Val, de la BOC-Ile.1/2H<sub>2</sub>O, du BOC-BEC-OH (74) et 1.3 g de résine oxime (20). **Clivage final:** Il est effectué selon le protocole 2.2.2.1 de la méthode générale. Nous obtenons un résidu résineux (*m* = 1.25 g) dont la pureté est mesurée par HPLC et estimée, supérieure à 75 %. Une fraction (150 mg) de ce brut est purifiée par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants et lyophilisation dans l'acide acétique, nous obtenons le peptide (67) désiré sous la forme de flocons blancs (*m* = 64 mg). HPLC anlt: (H) *R*<sub>t</sub> = 14.6 min; SM (ES): *m/z* 1722 = (*M* + NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, 1705 = (*M* + H)<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 7.60 (m, 1H, NH Ala), 7.46-7.33 (m, 3H, NH Leu 2 + 2 NH BEC), 7.29-7.27 (m, 2H, NH Ile + NH Val), 7.20-5.11 (m, 15H, 14 H Ar + NH-*n*-Pr), 5.98 (m, 1H, NH-BOC), 4.37-4.33 (m, 2H, 2 CαH BEC), 4.29-4.04 (m, 19 H, CαH Leu 2 + CαH Ala + CαH Ile + 8 CH<sub>2</sub>-OPh BEC), 3.95 (m, 1H, CαH Leu 1), 3.85-3.66 (m, 33H, CαH Val + 16 CH<sub>2</sub>-O), 3.23-2.96 (m, 6H, 2 CβH<sub>2</sub> BEC + N-CH<sub>2</sub>), 2.23 (sous le solvant, 1H, CβH Val), 1.90-1.20 (m, 23H, 2 CβH<sub>2</sub> Leu + CγH<sub>2</sub> Ile + 2 CγH Leu + CβH Ile + NCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Me + CH<sub>3</sub> Ala + 9 H *t*-Bu), 1.08 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 1.03 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Val), 0.97-0.80 (m, 21H, 4 CH<sub>3</sub> Leu + CγH<sub>3</sub> Ile + CδH<sub>3</sub> Ile + CH<sub>3</sub> *n*-Pr).

**Amide *n*-propylique de la (*N*-*t*-Butyloxycarbonyl-L-leucyl)-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-isoleucyl-L-prolyl-L-alanyl-[3-(dibenzo-24-couronne-8)-L-alanyl]-L-leucine**

**BOC-Leu-BEC-Ile-Pro-Ala-BEC-Leu-NH-*n*-Pr (68)**

**SPPS et clivage final:** Ils sont identiques à ceux utilisés pour le composé (67), en substituant la BOC-Pro à la BOC-Val. Nous obtenons un résidu résineux ( $m = 1.51$  g) dont la pureté est mesurée par HPLC et estimée supérieure à 90 %. Une fraction (190 mg) de ce brut est purifiée par HPLC semi-préparative. Après évaporation des solvants et lyophilisation dans l'acide acétique, nous obtenons le peptide (68) désiré sous la forme de flocons blancs ( $m = 109$  mg). HPLC anlt: (H)  $R_t = 9.3$  min; SM (ES):  $m/z$  1720 =  $(M + NH_4)^+$ , 1703 =  $(M + H)^+$ ; RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3CN$ ):  $\delta$  7.29 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H, NH BEC 1), 7.25 (m, 1H, NH Ala), 7.20 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, NH Leu 2), 7.05-7.04 (m, 2H, NH Ile + NH BEC 2), 6.99-6.73 (m, 15H, 14 H Ar + NH-*n*-Pr), 5.60 (m, 1H, NH-BOC), 4.63 (m, 1H, C $\alpha$ H BEC 2), 4.43 (m, 1H, C $\alpha$ H BEC 1), 4.38 (m, 1H, C $\alpha$ H Ile), 4.27-4.23 (m, 2H, C $\alpha$ H Pro + C $\alpha$ H Leu 2), 4.16-4.11 (m, 16H, CH $_2$ -OPh BEC), 4.06 (m, 1H, C $\alpha$ H Ala), 3.99 (m, 1H, C $\alpha$ H Leu 1), 3.88-3.79 (m, 16H, CH $_2$ -CH $_2$ -OPh BEC), 3.77-3.61 (m, 17H, 8 CH $_2$ -O BEC + C $\delta$ HH' Pro), 3.50 (m, 1H, C $\delta$ HH' Pro), 3.17-3.04 (m, 5H, N-CH $_2$  + C $\beta$ HH' BEC 1 + C $\beta$ HH' BEC 2), 2.95 (m, 1H, C $\beta$ HH' BEC 2), 2.18 (sous le solvant, 1H, C $\beta$ HH' Pro), 1.96-1.86 (m, 3H, C $\gamma$ H $_2$  Pro + C $\beta$ H Ile), 1.79 (m, 1H, C $\beta$ HH' Pro), 1.75-1.62 (m, 4H, 2 C $\gamma$ H Leu + C $\beta$ H $_2$  Leu 2), 1.55-1.48 (m, 3H, C $\gamma$ HH' Ile + NCH $_2$ -CH $_2$ -Me), 1.47-1.37 (m, 11H, C $\beta$ H $_2$

Leu 1 + 9 H *t*-Bu), 1.34 (d,  $J = 7.4$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub> Ala), 1.14 (m, 1H, C $\gamma$ HH' Ile), 0.94-0.82 (m, 21H, 4 CH<sub>3</sub> Leu + C $\gamma$ H<sub>3</sub> Ile + C $\delta$ H<sub>3</sub> Ile + CH<sub>3</sub> *n*-Pr).

### 3. EXPÉRIMENTATION

#### Études conformationnelles par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire (DC) dans un solvant organique (première partie)

Nous préparons une solution du peptide étudié, à une concentration de 1. mg/mL, dans le solvant choisi (TFE, méthanol ou DCE). Toutes les mesures sont effectuées à l'aide d'une cellule cylindrique en quartz de 0.01 à 0.1 cm à 25 °C et par rapport à la référence constituée par le solvant seul. Les valeurs sont exprimées en *ellipticité molaire moyenne par résidu* ( $\Theta$ , deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>), c'est à dire en considérant que la masse molaire du peptide est celle d'un acide aminé moyen (109 g/mol). Les courbes sont présentées après réduction du bruit par traitement mathématique.

Paramètres utilisés:

- longueur de la bande: 1.0 nm
- sensibilité: 5 mdeg
- temps de réponse: 1 s
- longueur d'onde initiale 250 nm
- longueur d'onde finale: 190 nm (200

nm dans le 1,2-dichloroéthane)

- vitesse de balayage: 100 nm/min
- résolution: 0.2 nm
- nombre d'accumulations: 20-30

### **Études conformationnelles par spectropolarimétrie de dichroïsme circulaire (DC) dans des vésicules (10a)**

Nous préparons une solution du peptide étudié (3 mg) dans du chloroforme (0.5 mL). D'un autre côté, nous préparons une solution de lécithine de jaune d'oeuf dans du chloroforme (0.5 mL), de façon à avoir un ratio molaire lipide/peptide d'environ 80:1. Les deux solutions sont mélangées, et nous évaporons le solvant par un flux d'hélium. Puis, le mélange est mis sous vide dans un dessiccateur. Après 2 h de séchage, nous hydratons le résidu par du HCl 0.01 N (3 mL), nous agitons la suspension laiteuse sur un vortex pendant 1 min puis, nous la sonicons pendant 15 min. Si nous réussissons à obtenir une solution limpide, nous prenons les mesures de DC en utilisant une cellule de 0.01 cm, à 25 °C. La référence est constituée par une solution de vésicules préparée selon la méthode décrite ci-dessus, en absence de peptide. Les paramètres utilisés sont identiques à ceux décrits dans la section précédente.

### **Études conformationnelles par spectroscopie infrarouge (FT-IR) dans des bicouches lipidiques**

Nous dissolvons le peptide (**29**) (2.5 mg,  $5.7 \cdot 10^{-4}$  mmol) dans du chloroforme (1 mL) et ajoutons de la DPPC (4.2 mg,  $5.7 \cdot 10^{-3}$  mmol). Le

solvant est évaporé sous un flux d'azote puis, séché sous vide poussé pendant 10 h. Par la suite, le résidu est hydraté par du D<sub>2</sub>O (35 µL) et agité sur un vortex. Nous réalisons cinq séquences de « gel-dégel » par chauffage à 65 °C (au dessus de la température de transition du lipide, 3 min), alternant avec des agitations sur le vortex et des refroidissements à l'azote liquide. La préparation est étendue sur une pastille de CaF<sub>2</sub> et les mesures sont effectuées à 25 °C.

### **Mesure de conductivité monomoléculaire par la méthode de « *patch-clamp* »**

Ces études ont été effectuées au laboratoire du Professeur G. Andrew Woolley (Department of Chemistry, University of Toronto), avec l'aide de Dominic Jaikaran.

Nous préparons une solution de peptide à 0.1 mM dans le méthanol et deux solutions à 5 mg/mL de diphytanoylglycérol phosphocholine dans l'hexadecane, et de monooléate de glycérol dans le decane. Nous préparons une solution de chlorure de potassium à 1 M dans de l'eau ultra-pure filtrée, après avoir chauffé le sel à 650 °C pendant 2 h.

Nous revêtons de chlorure d'argent des electrodes en argent, en les plongeant dans une solution d'HCl 0.1 N.

Tout le matériel (cellule en Téflon, embouts de pipettes et électrodes) est lavé scrupuleusement par:

- du méthanol, plusieurs fois
- de l'eau distillée, plusieurs fois
- de l'acide sulfochromique, pendant 30 min

- de l'eau ultrapure filtrée, plusieurs fois
- de l'eau ultrapure filtrée, quatre fois, après une sonication de 15 min dans l'eau ultrapure
- du méthanol grade HPLC
- de l'acétone grade HPLC
- de l'éther de pétrole

Nous réalisons le montage décrit dans la Figure 33 puis, enregistrons les résultats.

Protocole 1: La bicouche est préparée sur l'embout de pipette. Nous vérifions sa stabilité et l'absence de tout contaminant, comme la gramicidine, lorsque nous obtenons une ligne de base stable pendant au moins 2 min. Puis, 2  $\mu$ L de solution de peptide sont introduits dans la cuve et les résultats enregistrés.

Protocole 2: Nous préparons un mélange de solution de peptide (2  $\mu$ L) et de solution de lipide (50  $\mu$ L). Le méthanol est évaporé sous un dessiccateur puis, la préparation est utilisée pour construire les bicouches lipidiques.

Dans les deux cas, la différence de potentiel appliquée est de +100 mV. Les enregistrements sont filtrés (filtre de 200 à 1000 Hz) et traités avec le logiciel SYNAPSE.

### **Études d'orientation dans les bicouches lipidiques par réflexion totale atténuée (ATR)**

Ces études ont été effectuées au laboratoire de la Professeure M. Auger (Département de Chimie, Université Laval), avec l'aide de Mario Bouchard et de Sacha Bonenfant.

Nous préparons une solution à 5 mg/mL du peptide (29) dans du méthanol et ajoutons de la DPPC ou de la DMPC, de façon à avoir un ratio lipide/peptide de 30:1. La solution est mise dans un dessiccateur et le solvant est évaporé sous vide. Après 24 h, le résidu est repris par 150  $\mu$ L de D<sub>2</sub>O et le mélange est agité vigoureusement sur un vortex. Nous réalisons cinq séquences de « gel-dégel » par chauffage à 65 °C (3 min), alternant avec des agitations sur le vortex et des refroidissements à l'azote liquide. La suspension est alors étendue sur un cristal à ATR en germanium. Nous laissons s'évaporer l'eau puis, mettons le cristal dans le spectrophotomètre. Après une purge de 5 min à l'argon, les résultats sont enregistrés à 21 °C.

Paramètres utilisés:	- résolution: 2 $\text{cm}^{-1}$
	- nombre d'acquisitions: 250
	- détecteur: MCT

Les données sont par la suite traitées à l'aide du logiciel OMNIC.

### **Études d'évaluation de l'activité antibiotique et de la cytotoxicité**

Ces études ont été effectuées dans le laboratoire de la Professeure Ann Huletsky (Faculté de Médecine, Université Laval) pour l'activité antibiotique; dans le laboratoire du Dr. René Gaudreault (Hôpital St-François d'Assise, Québec) pour les tests sur les cellules cancéreuses.

Les souches bactériennes utilisées sont:

- *Burkholderia cepacia* ATCC 10856

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27855
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303
- *Proteus vulgaris* ATCC 13315
- *Citrobacter freundii* ATCC 8090
- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

et les lignées de cellules cancéreuses sont:

- MDA MB1231 (cancer du sein)
- P388 D1 (leucémie de souris).

Nous déterminons au préalable les taux de DMSO ou de méthanol que peuvent tolérer les cellules puis, l'on prépare des solutions-mères des composés à tester dans le DMSO ou le méthanol. De l'eau est ajoutée de façon à obtenir une teneur de 2 % en DMSO ou de 4 % en méthanol. Ensuite, nous réalisons des dilutions séquentielles des solutions-mères en vue des tests. Les cellules sont disposées dans des puits ELISA contenant un milieu de culture TSB (bactéries) ou RPMI 1640 (cellules cancéreuses); puis, nous leurs additionnons les diverses solutions des composés. L'incubation est d'une durée de 24 h à 37 °C (bactéries) ou de 72 h à 37 °C (cellules cancéreuses). A la fin de l'incubation, nous déterminons l'efficacité du composé par mesure de densité optique (DO, bactéries) ou par mesure d'absorbance à 570 nm, après



coloration au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium (MTT) (cellules cancéreuses).

### **Préparation des [2]Pseudorotaxanes**

Nous dissolvons le peptide (3-4 mg, 1 éq) dans du DCM (1 mL). Nous ajoutons le sel d'ammonium DA•2PF<sub>6</sub> (**69**) ou TA•3PF<sub>6</sub> (**70**) (1 éq), suivant le cas. La suspension est soniquée pendant 2 min. Puis, nous mettons sous vigoureuse agitation magnétique pendant 10 h. Par la suite, nous filtrons le mélange à l'aide d'une seringue munie d'un filtre à 0.45 µm et évaporons le filtrat à sec, sous vide, dans un dessiccateur. Le résidu sera repris par un solvant deutérié, pour les études par RMN, ou envoyé tel quel en analyse par spectrométrie de masse.

### **Études des [2]Pseudorotaxanes par résonance magnétique nucléaire (RMN) <sup>1</sup>H 500 MHz**

Les solvants deutériés utilisés sont le chloroforme (CDCl<sub>3</sub>) ou l'acétonitrile (CD<sub>3</sub>CN).

Paramètres d'acquisition utilisés:

Expériences de COSY: **F2**. AQ = 0.131122 sec; DW = 128 µsec; D1 = 1.8 sec; D0 = 0.000003 sec; DE = 182.86 µsec; INO = 0.000128 sec; P1 = 6.3 µsec; D13 = 0.000003 sec; TD = 1024; DS = 16. **F1**. NDO = 2; TD = 512; SWH = 3906.23 Hz.

Expérience de TOCSY: **F2**. AQ = 0.131122 sec; DW = 128  $\mu$ sec; D1 = 2 sec; D0 = 0.000003 sec; P1 = 6.3  $\mu$ sec; P17 = 2500  $\mu$ sec; P7 = 72  $\mu$ sec; P5 = 24  $\mu$ sec; TD = 1024; DS = 16; HL1 = 0 dB; D12 = 0.00002 sec; D13 = 0.000004 sec; HL3 = 14 dB; P6 = 36  $\mu$ sec; L1 = 30; DE = 182.86  $\mu$ sec; INO = 0.000128 sec. **F1**. NDO = 2; TD = 512; SWH = 3906.23 Hz.

## Études conformationnelles sur les [2]Pseudorotaxanes par DC (deuxième partie)

Nous préparons une solution de peptide à 1mg/mL dans l'acétonitrile (3 mL). Nous prélevons un aliquot de la solution de peptide libre que nous filtrons à l'aide d'une seringue munie d'un filtre à 0.45  $\mu$ m. Nous l'introduisons dans une cellule de DC cylindrique de 0.01 cm en quartz puis, effectuons les mesures à températures variables. Ensuite, nous ajoutons à la solution-mère peptidique le sel DA•2PF<sub>6</sub> (**69**) ou TA•3PF<sub>6</sub> (**70**) (1 éq), suivant le cas. La solution est agitée de 1 à 10 h suivant la solubilité des composants. Puis, elle est filtrée et étudiée par DC selon la méthode décrite pour le peptide libre.

Si le composé étudié (peptide ou complexe) est soluble dans l'acétonitrile, les valeurs mesurées sont exprimées en *ellipticité molaire moyenne par résidu*, en degré.centimètrecarré par décimole ( $\Theta$ , deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>). Dans ces cas, la masse molaire utilisée pour les calculs est celle de l'acide aminé moyen: 109 g/mol. Sinon, elles seront données comme simple signal de DC, en millidegré (DC, mdeg). Les courbes sont présentées après réduction du bruit par traitement mathématique.

- Paramètres d'acquisition utilisés:
- longueur de la bande: 1.0 nm
  - sensibilité: 5 mdeg
  - temps de réponse: 1 s
  - longueur d'onde initiale 250 nm
  - longueur d'onde finale: 190 nm
  - vitesse de balayage: 100 nm/min
  - résolution: 0.2 nm
  - nombre d'accumulations: 30

### **Mesure des constantes d'association ( $K_a$ ) par la méthode d'extraction des picrates (101,102,104)**

Nous préparons des solutions 1 mM dans le chloroforme des 4 peptides (63), (64), (67) et (68) étudiés. D'un autre côté, nous préparons une solution 1 mM du dipicrate (91) dans de l'eau déionisée et filtrée, ainsi qu'une solution saturée du dipicrate (90) dans ce même solvant. Les solutions sont dosées par spectrophotométrie d'absorption visible et les concentrations mesurées sont  $9.5 \cdot 10^{-4}$  M et  $6.7 \cdot 10^{-5}$  M, respectivement.

Test standard: Nous introduisons dans un flacon, muni d'un bouchon et d'un petit agitateur magnétique, la solution peptidique (400  $\mu$ L) et la solution de dipicrate (400  $\mu$ L). Le mélange biphasique est agité vigoureusement pendant 30 min. Puis, nous le transférons dans une petite éprouvette, que nous recouvrons de parafilm et centrifugeons à 2000 tours/min, pendant 20 min. A la fin, nous prélevons précautionneusement 200  $\mu$ L de la phase organique et les diluons à 2 mL dans de l'acétonitrile. Les solutions ainsi obtenues seront

dosées par spectrophotométrie d'absorption visible à la longueur d'onde d'absorption maximale du picrate ( $\lambda_{\text{max}} = 375 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{\text{max}} = 17400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), sur un spectrophotomètre à double faisceau. Chaque test standard est effectué à trois reprises et chaque mesure d'absorbance est prise cinq fois.

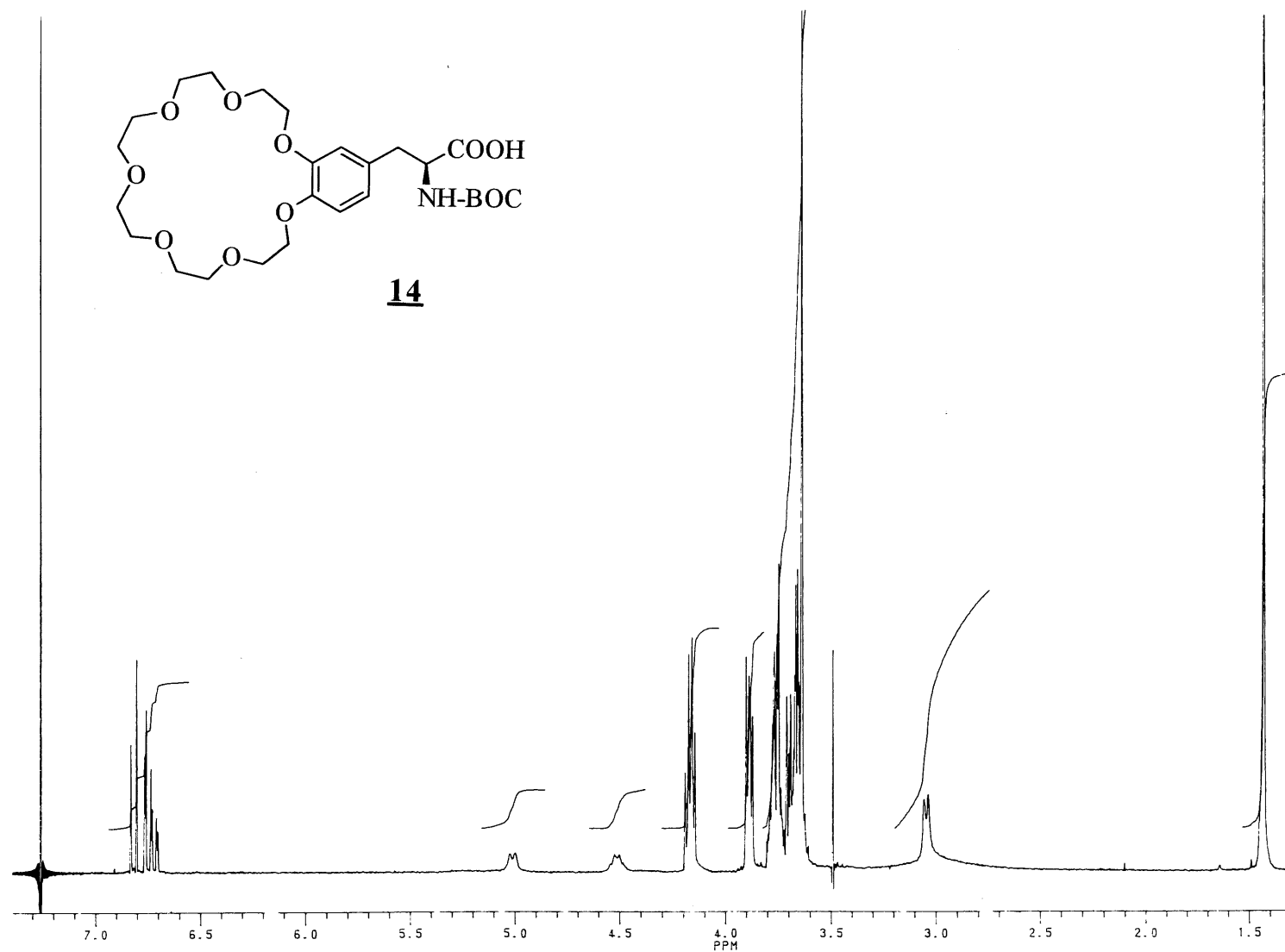
Test de référence: Nous réalisons l'expérience décrite ci-dessus, mais en substituant du chloroforme (400  $\mu\text{L}$ ) à la solution peptidique.

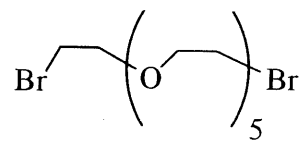
Blanc: Il est constitué d'un mélange acétonitrile-chloroforme 4:1 (2 mL).

## ANNEXES

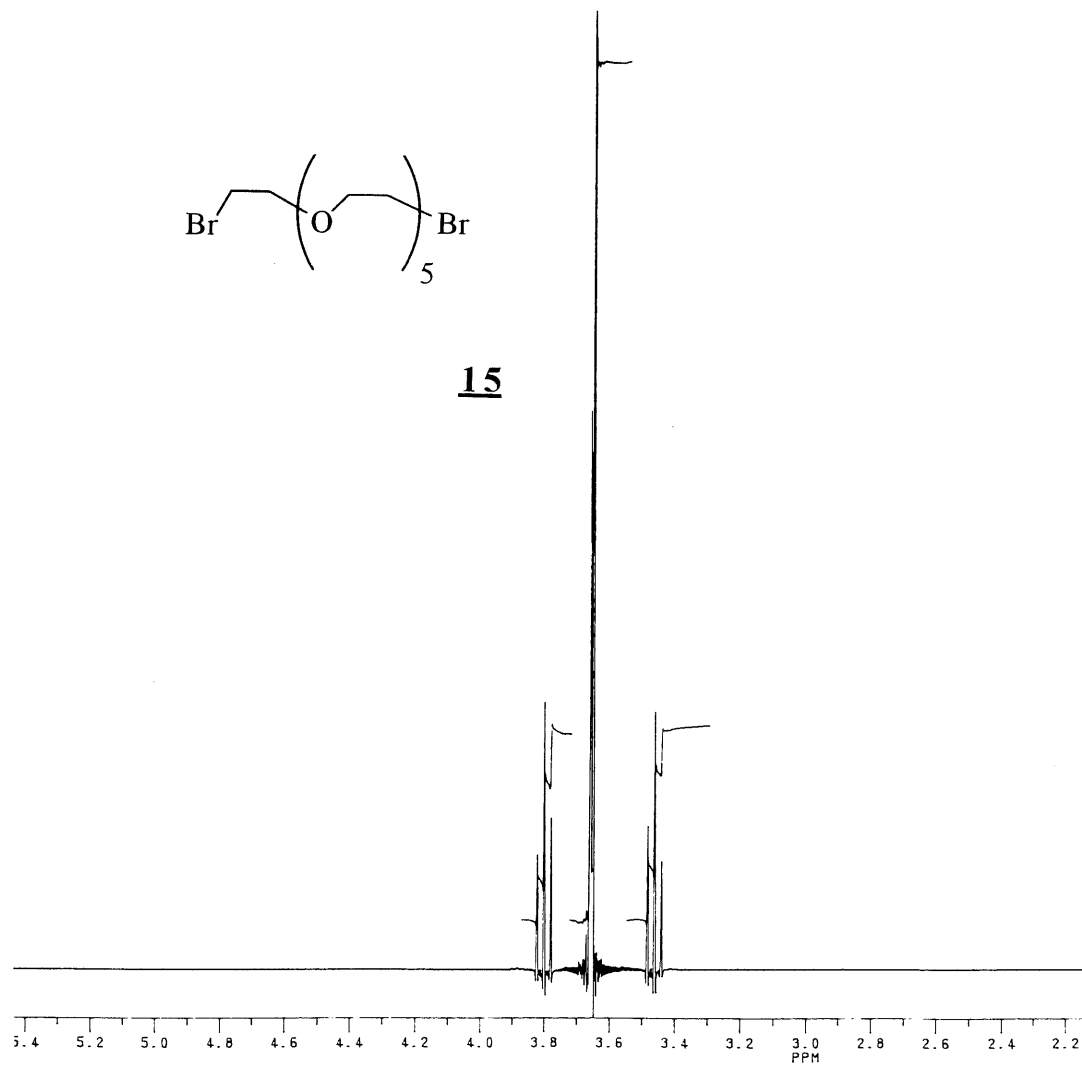
## **ANNEXE 1**

### **SPECTRES DE RMN $^1\text{H}$ À UNE DIMENSION**

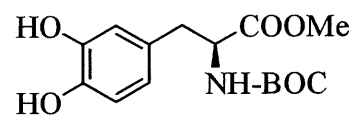




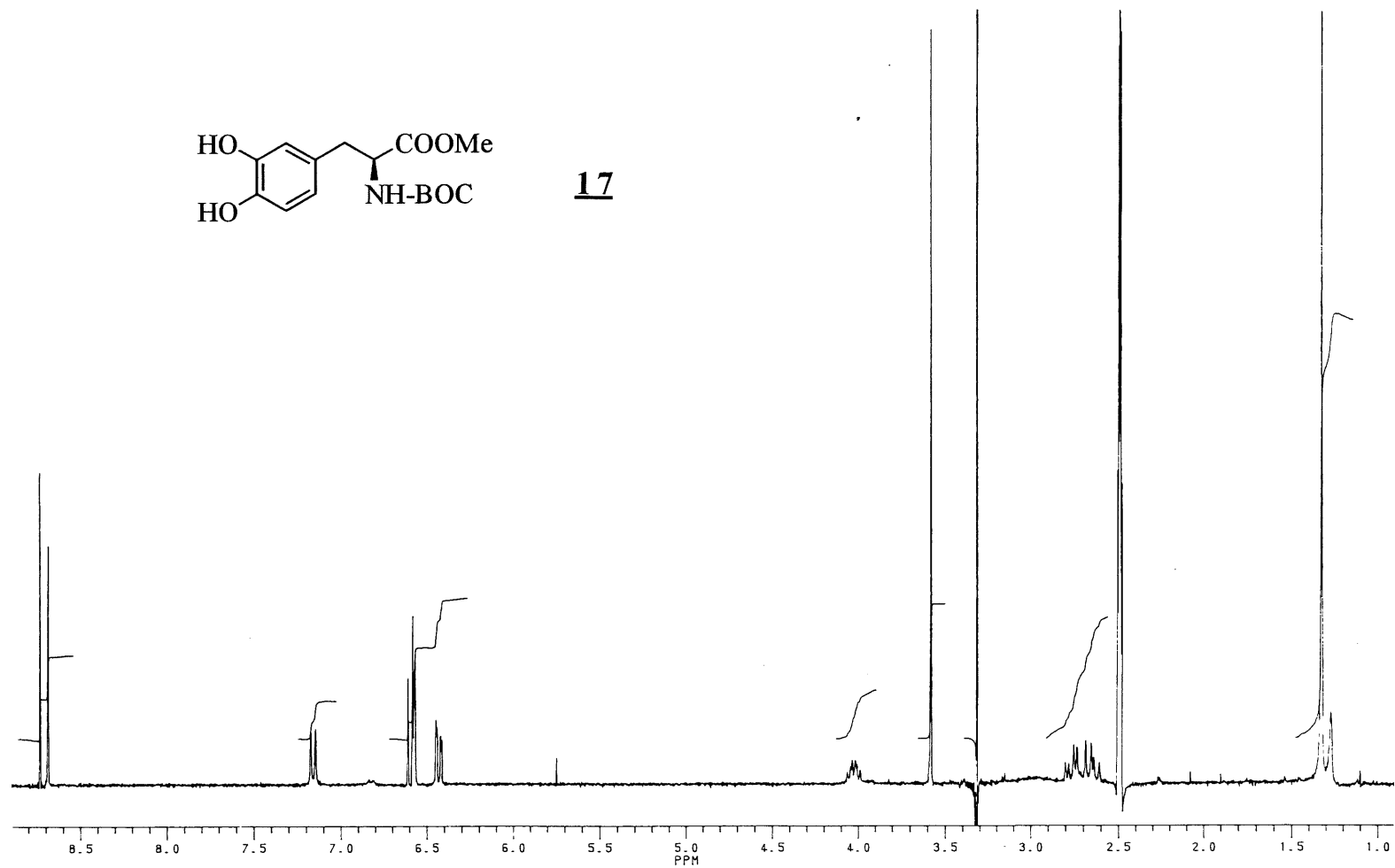
15

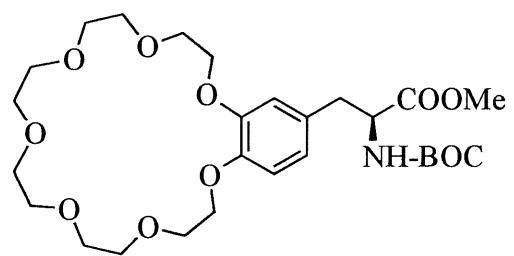




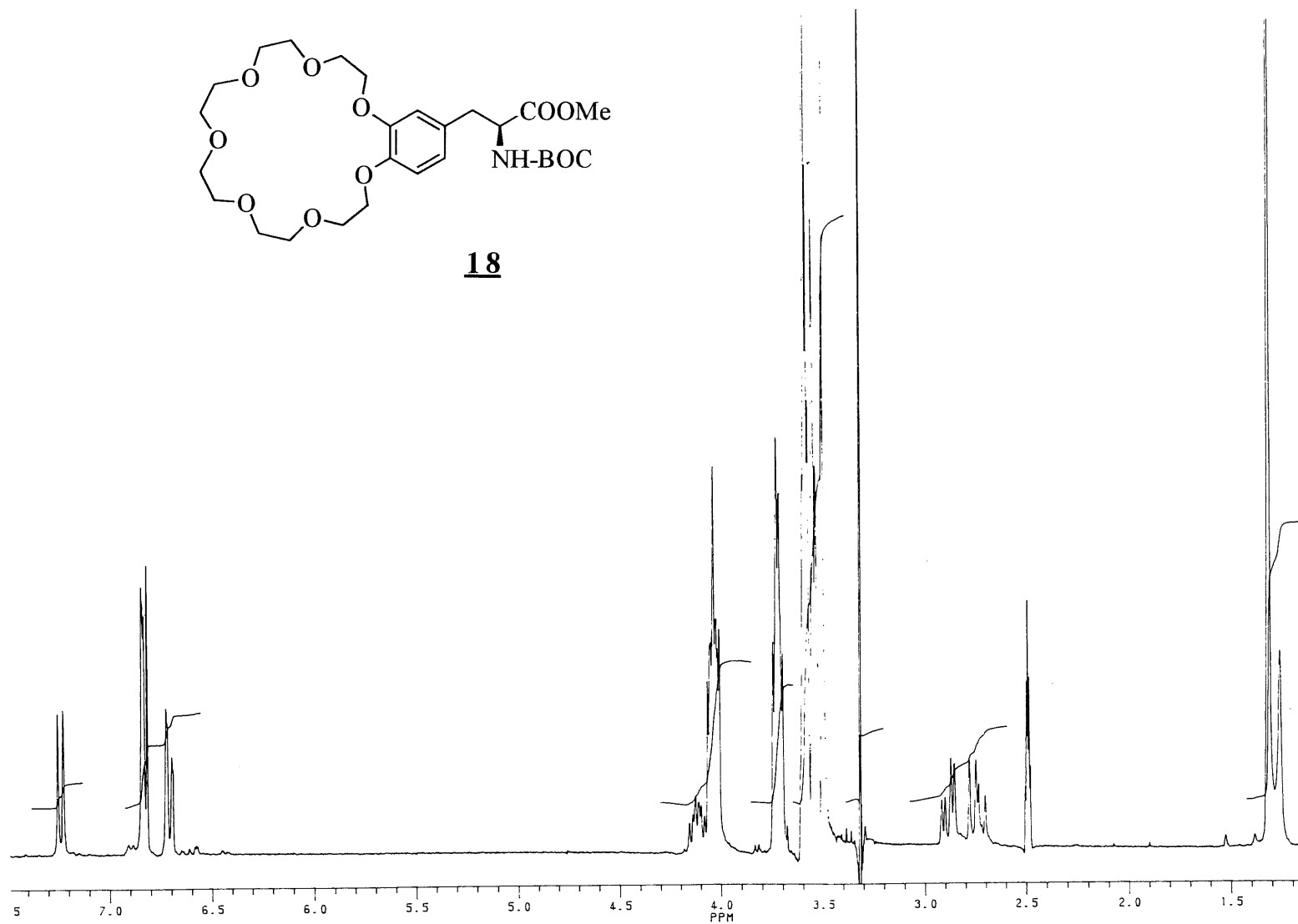


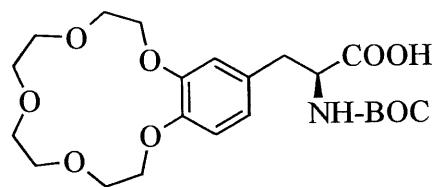
17



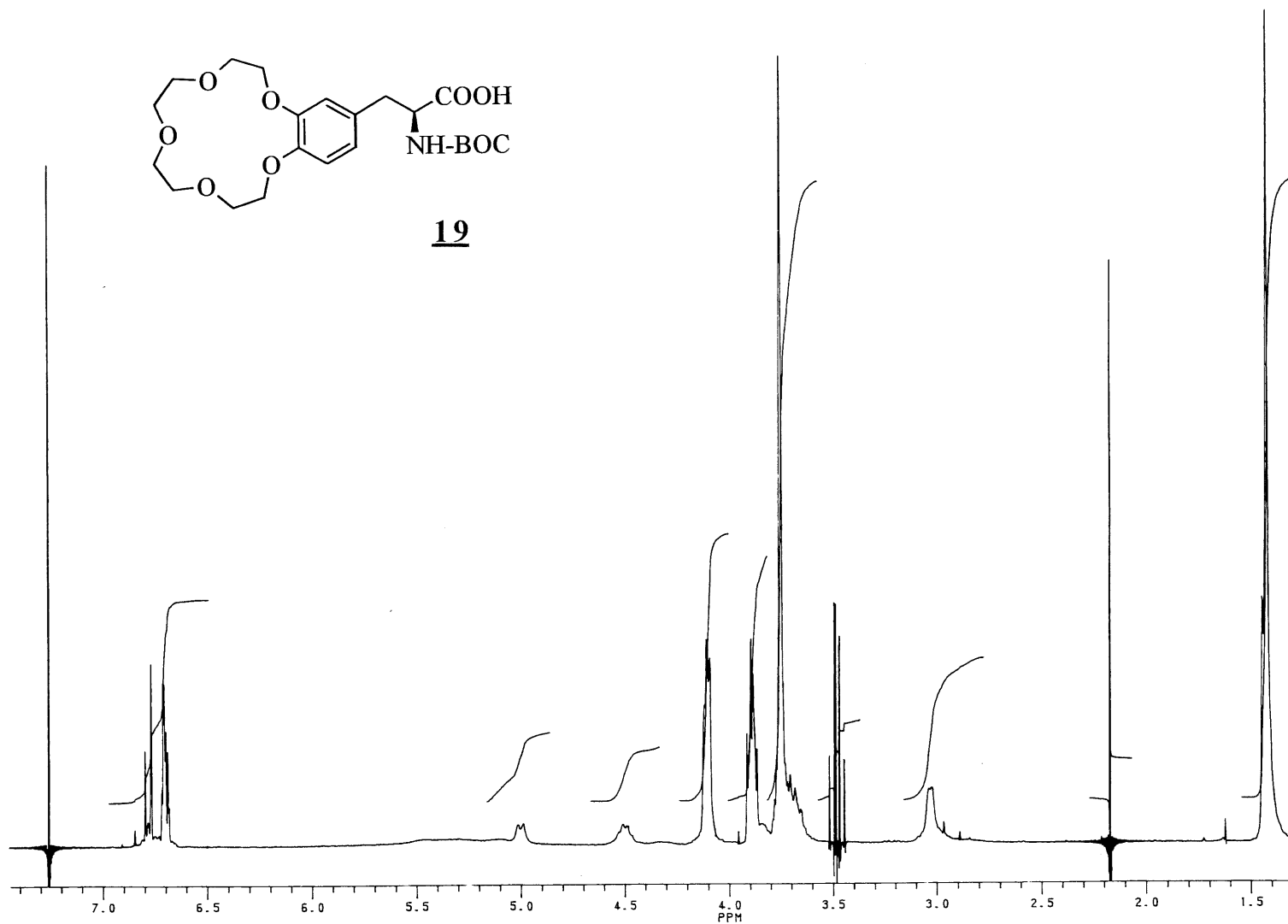


**18**

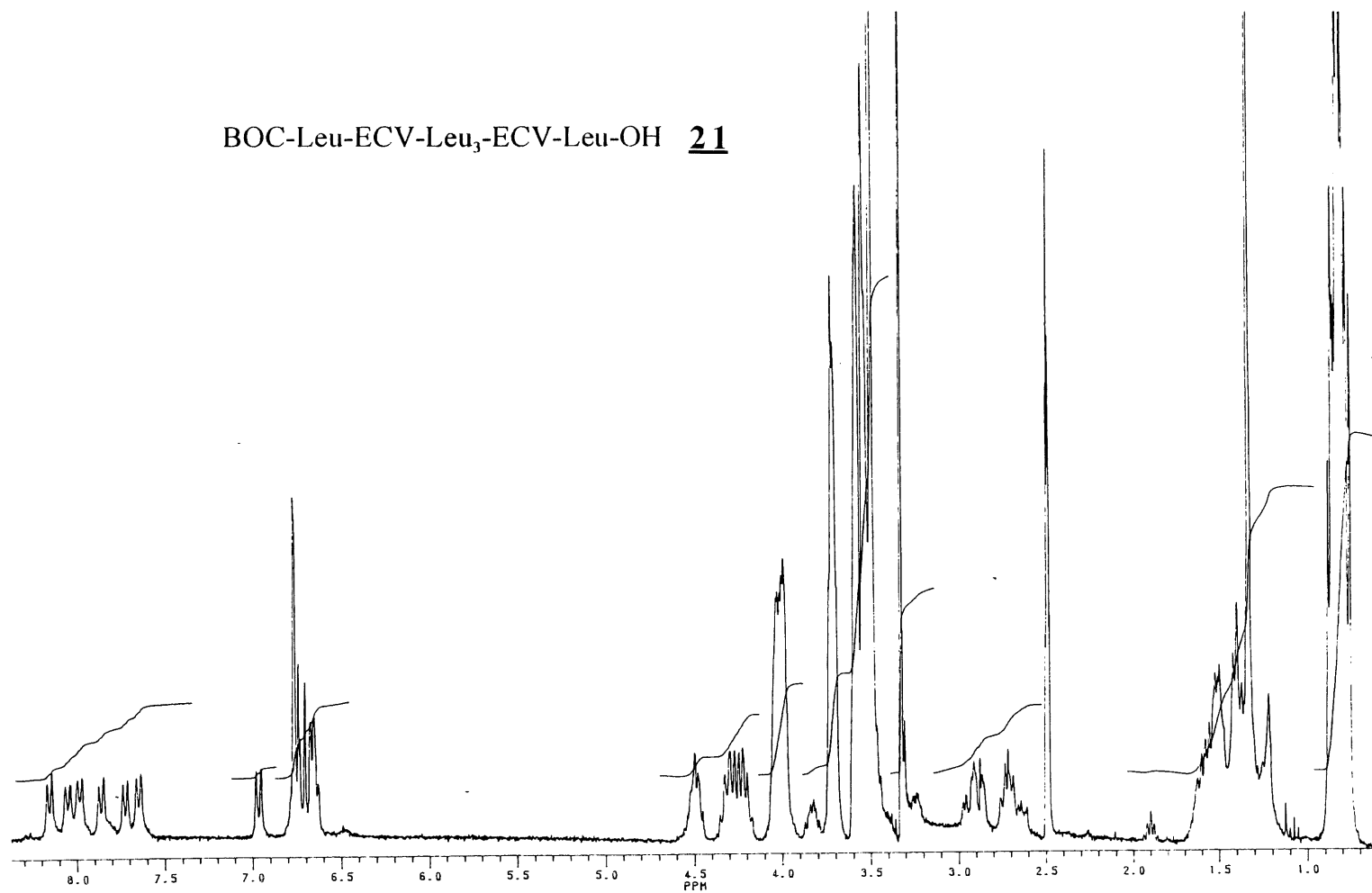




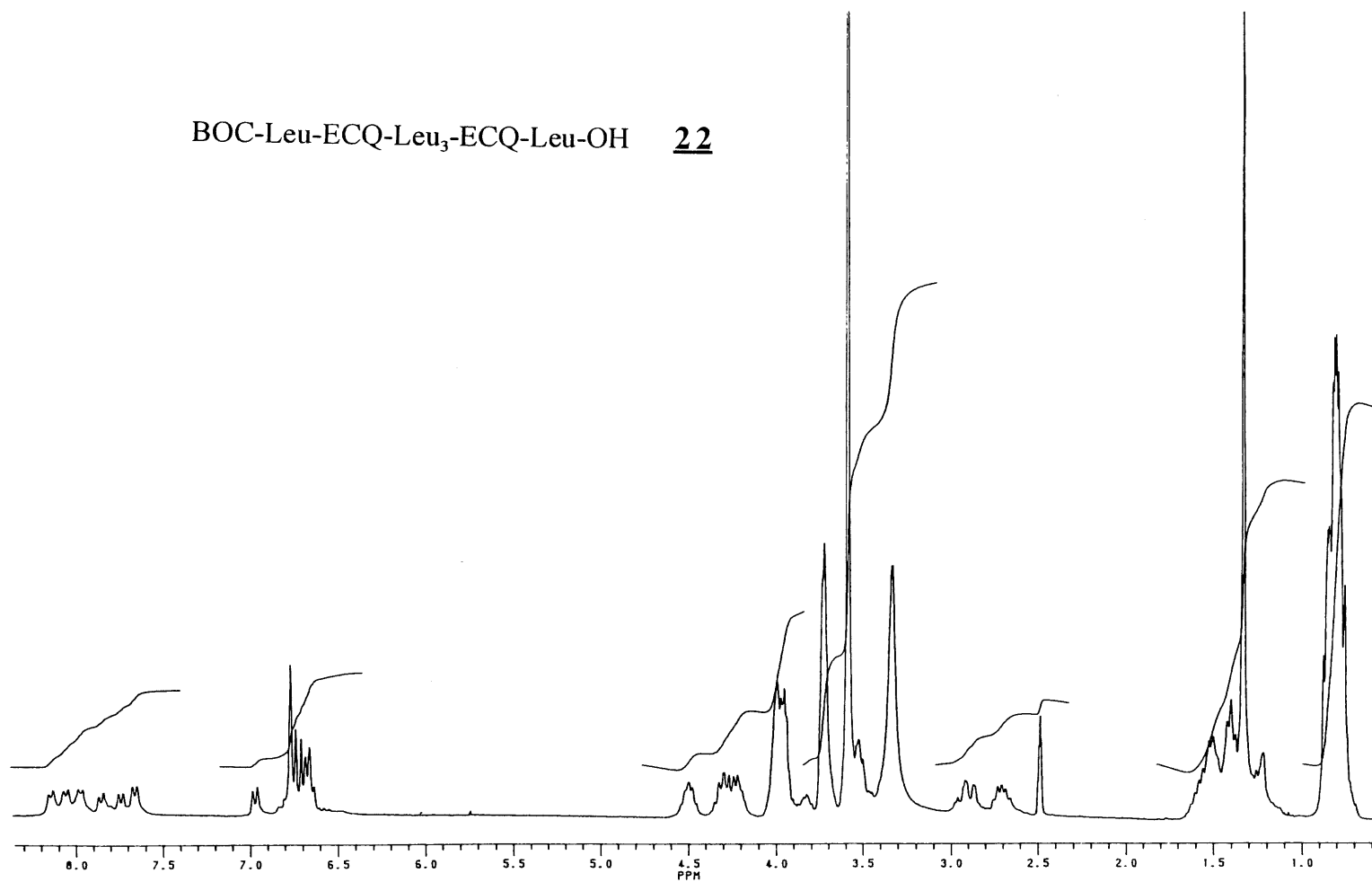
**19**



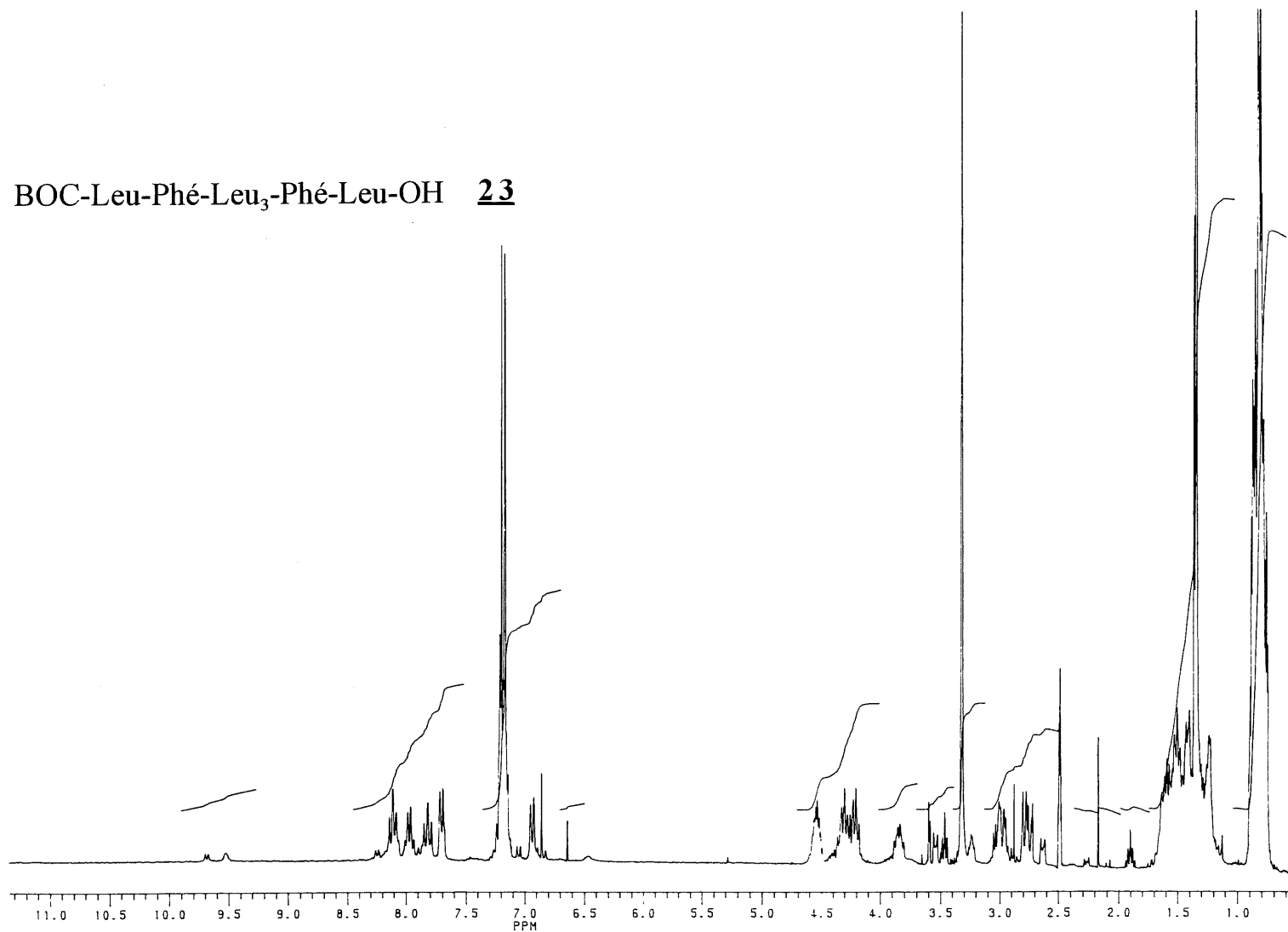
BOC-Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu-OH **21**



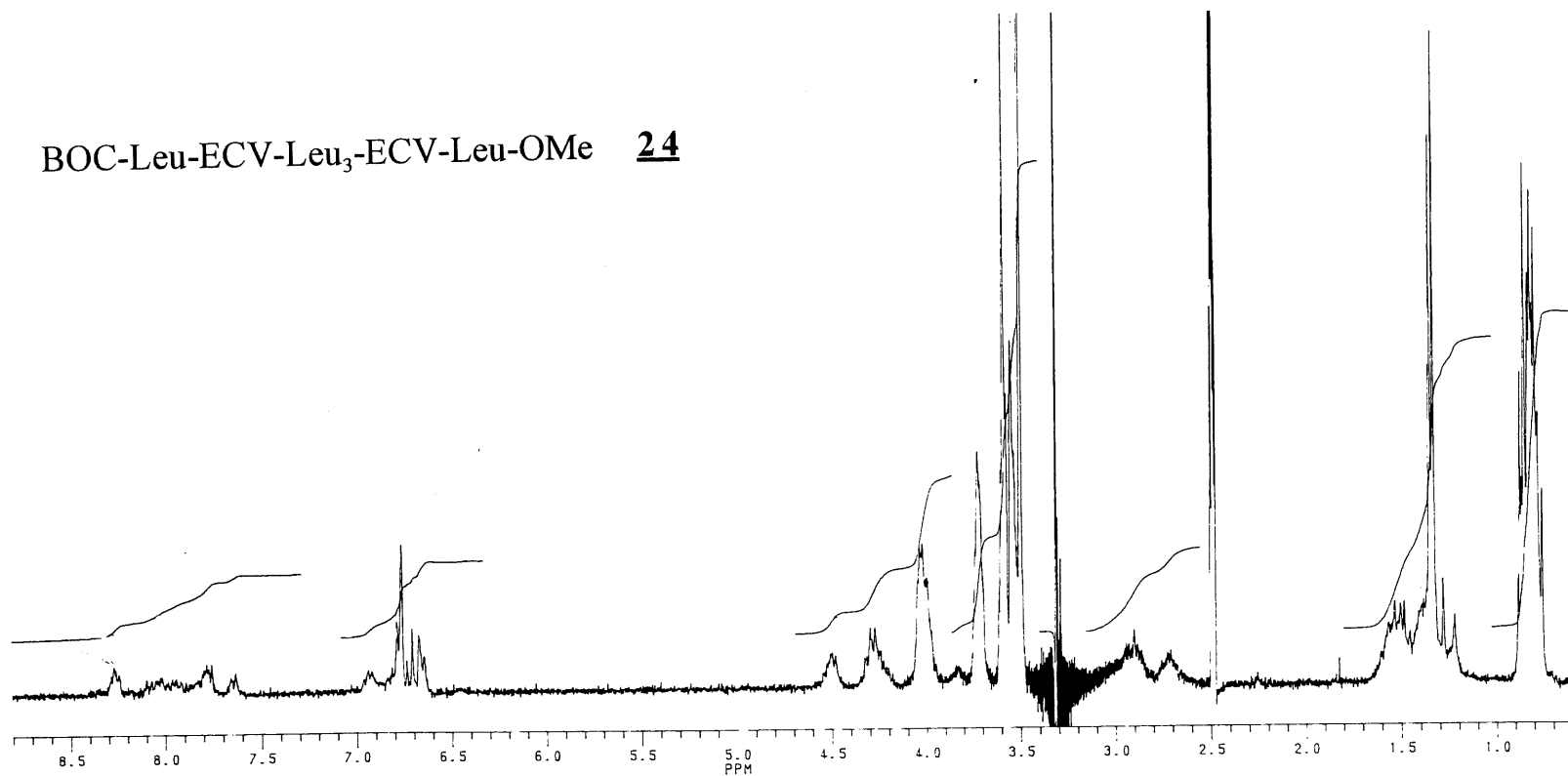
BOC-Leu-ECQ-Leu<sub>3</sub>-ECQ-Leu-OH 22



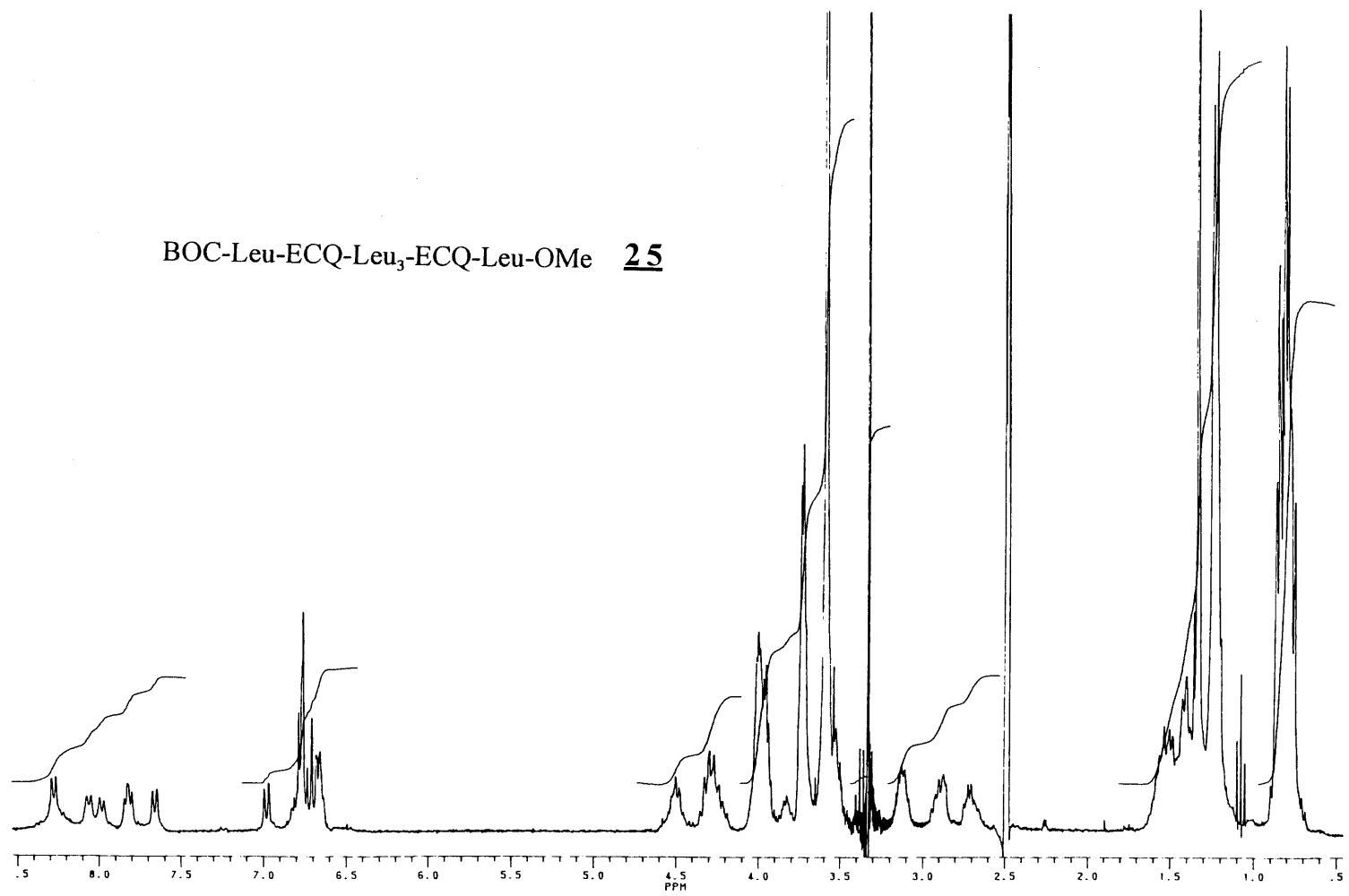
BOC-Leu-Phé-Leu<sub>3</sub>-Phé-Leu-OH **23**



BOC-Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu-OMe **24**

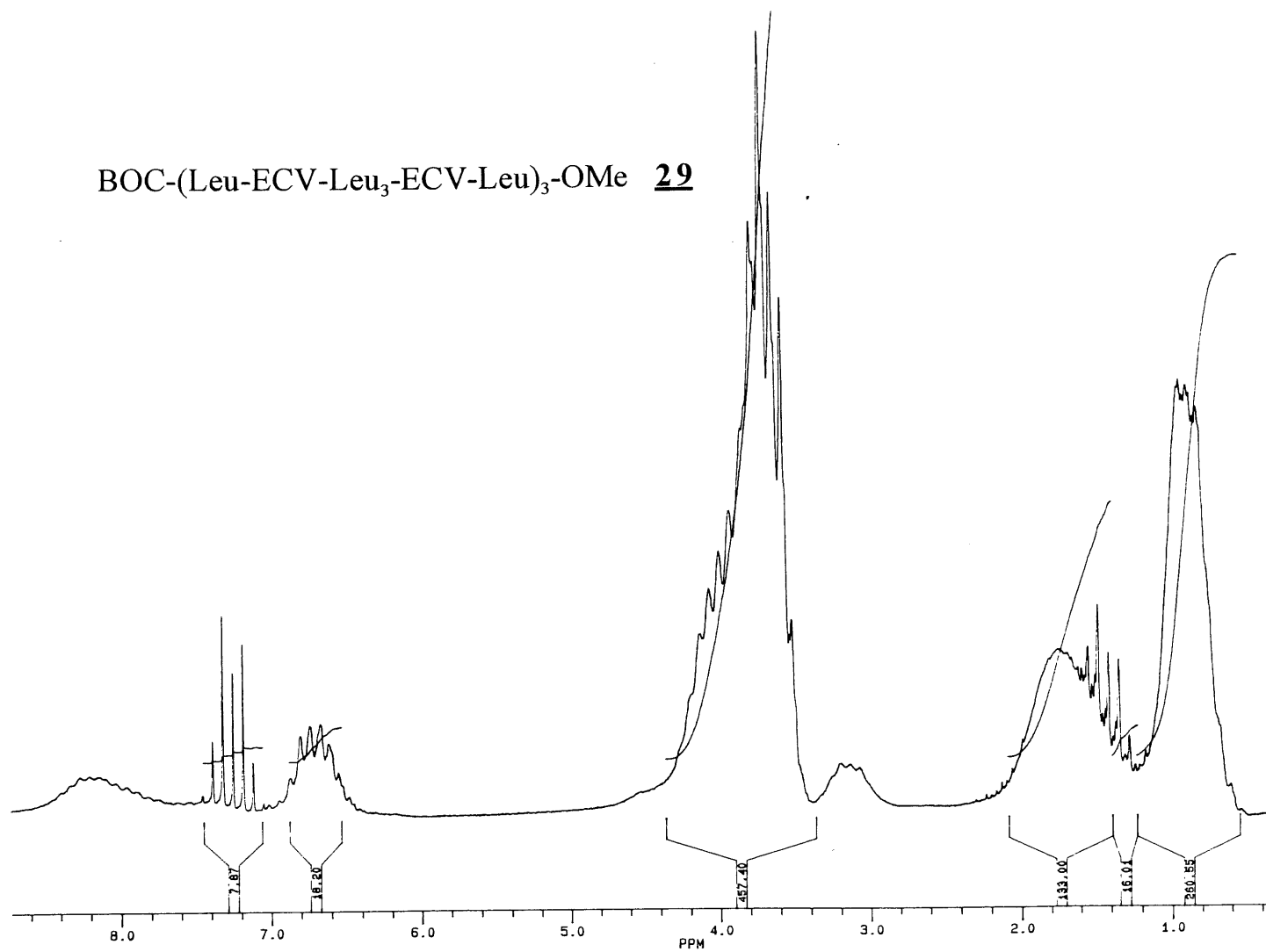


BOC-Leu-ECQ-Leu<sub>3</sub>-ECQ-Leu-OMe 25

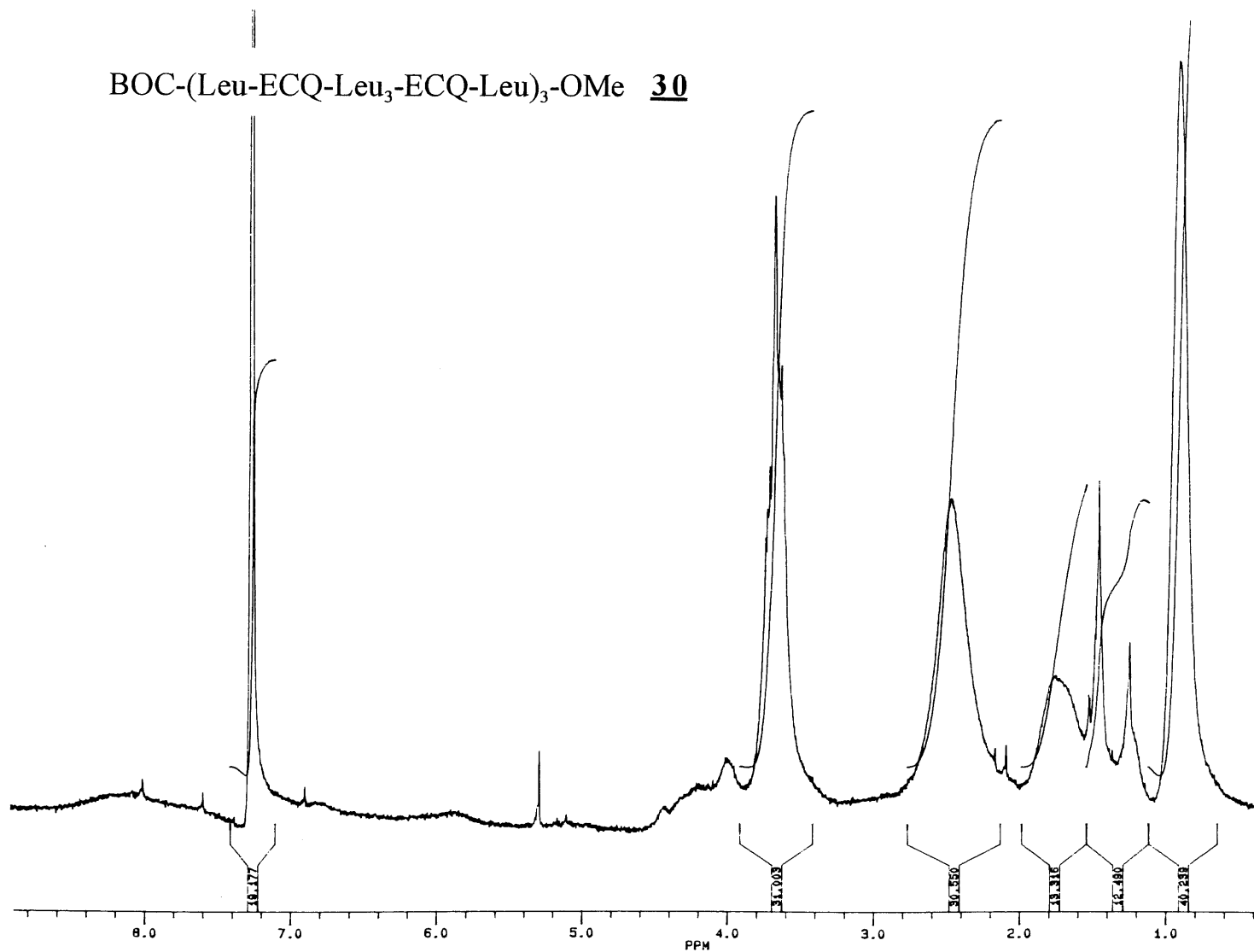




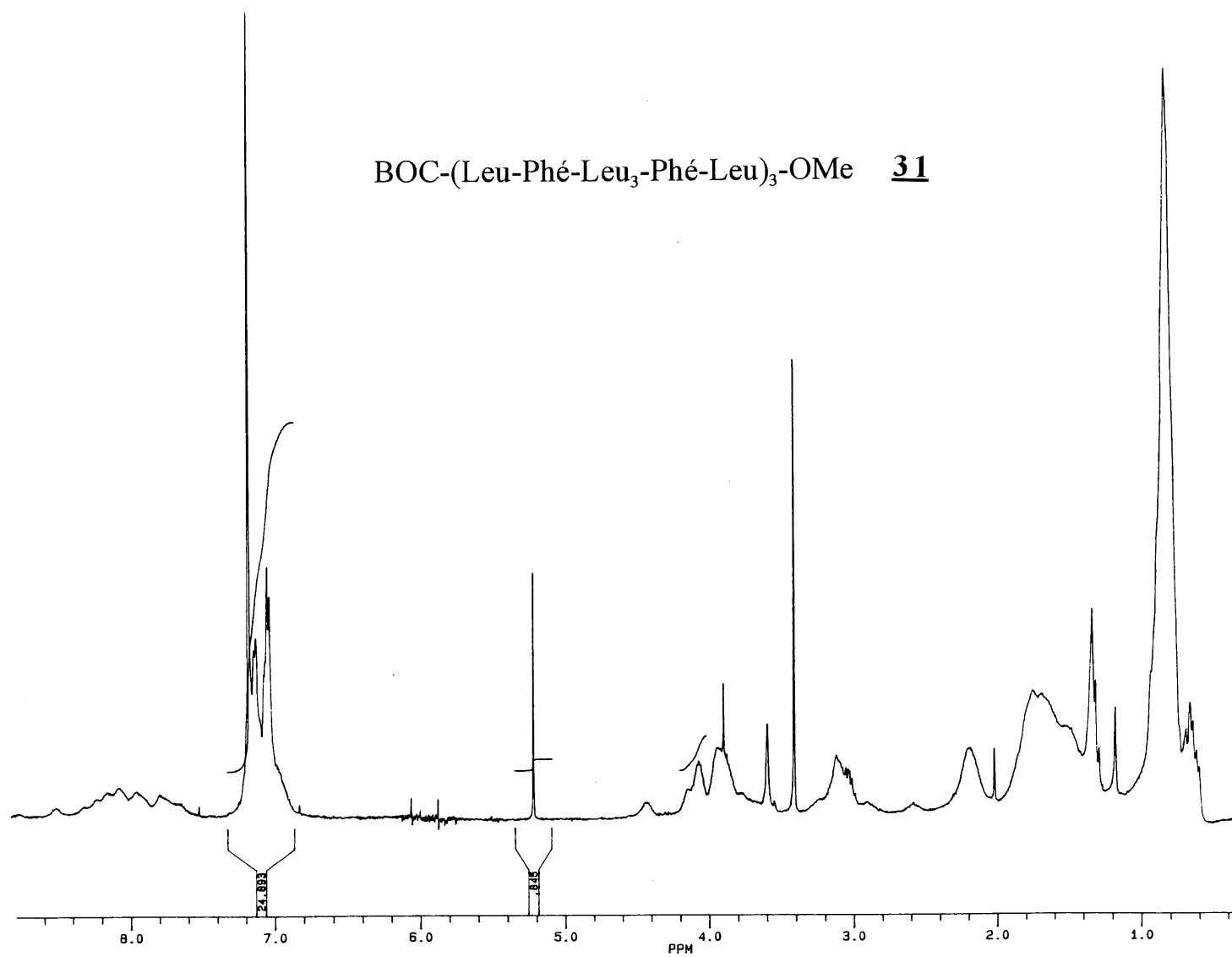
BOC-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-OMe **29**



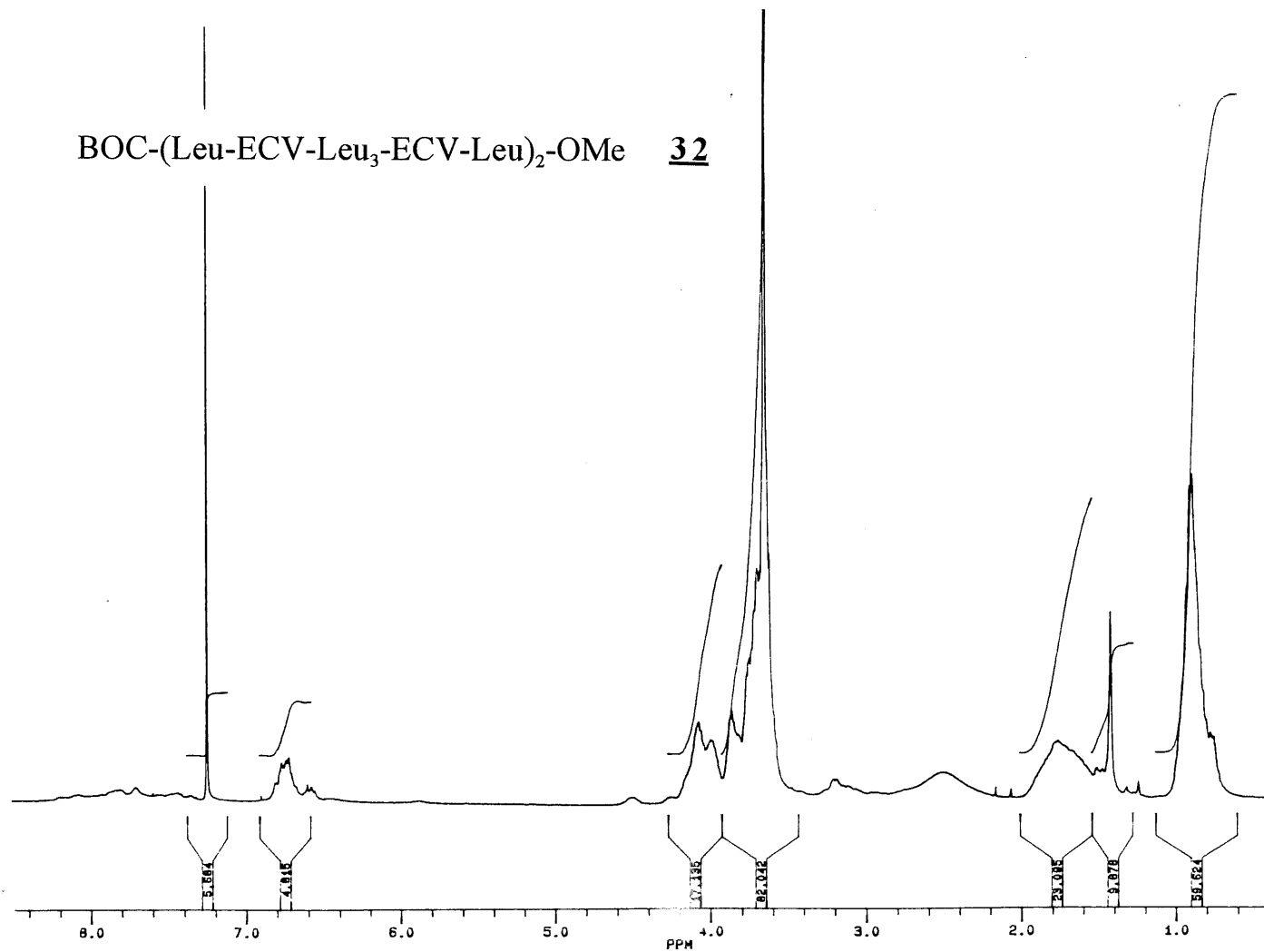
BOC-(Leu-ECQ-Leu<sub>3</sub>-ECQ-Leu)<sub>3</sub>-OMe 30



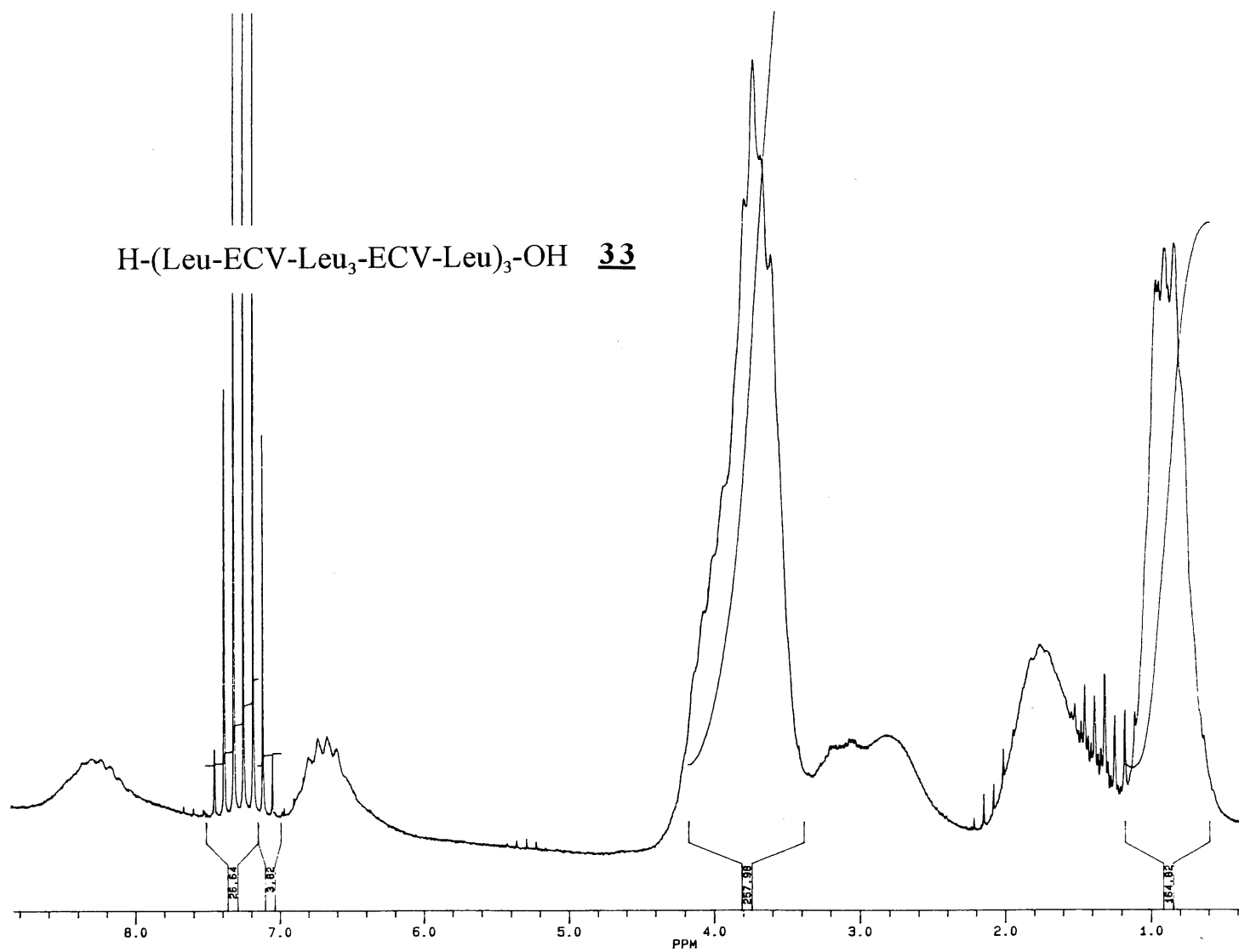
BOC-(Leu-Phé-Leu<sub>3</sub>-Phé-Leu)<sub>3</sub>-OMe **31**



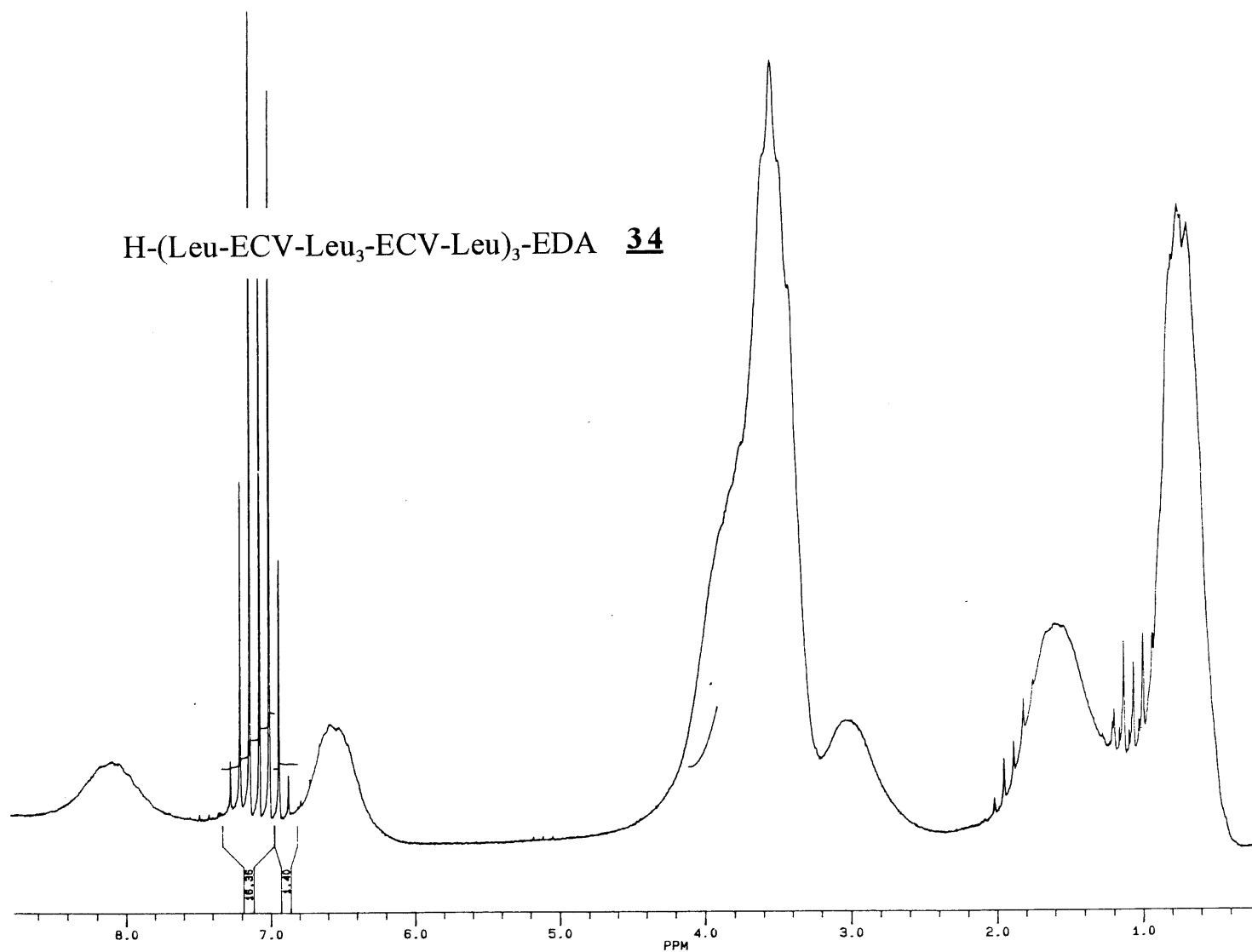
BOC-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>2</sub>-OMe 32



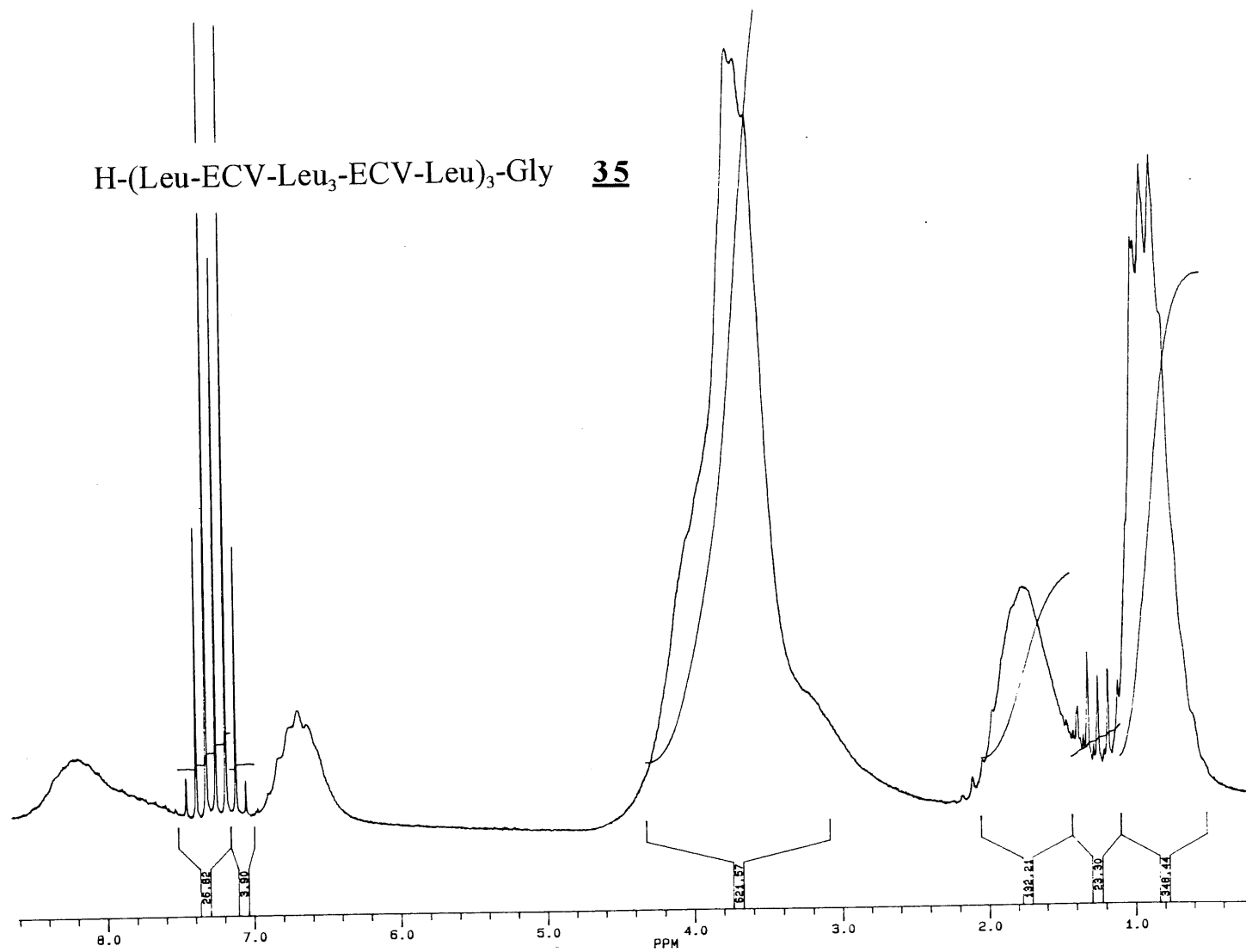
H-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-OH **33**



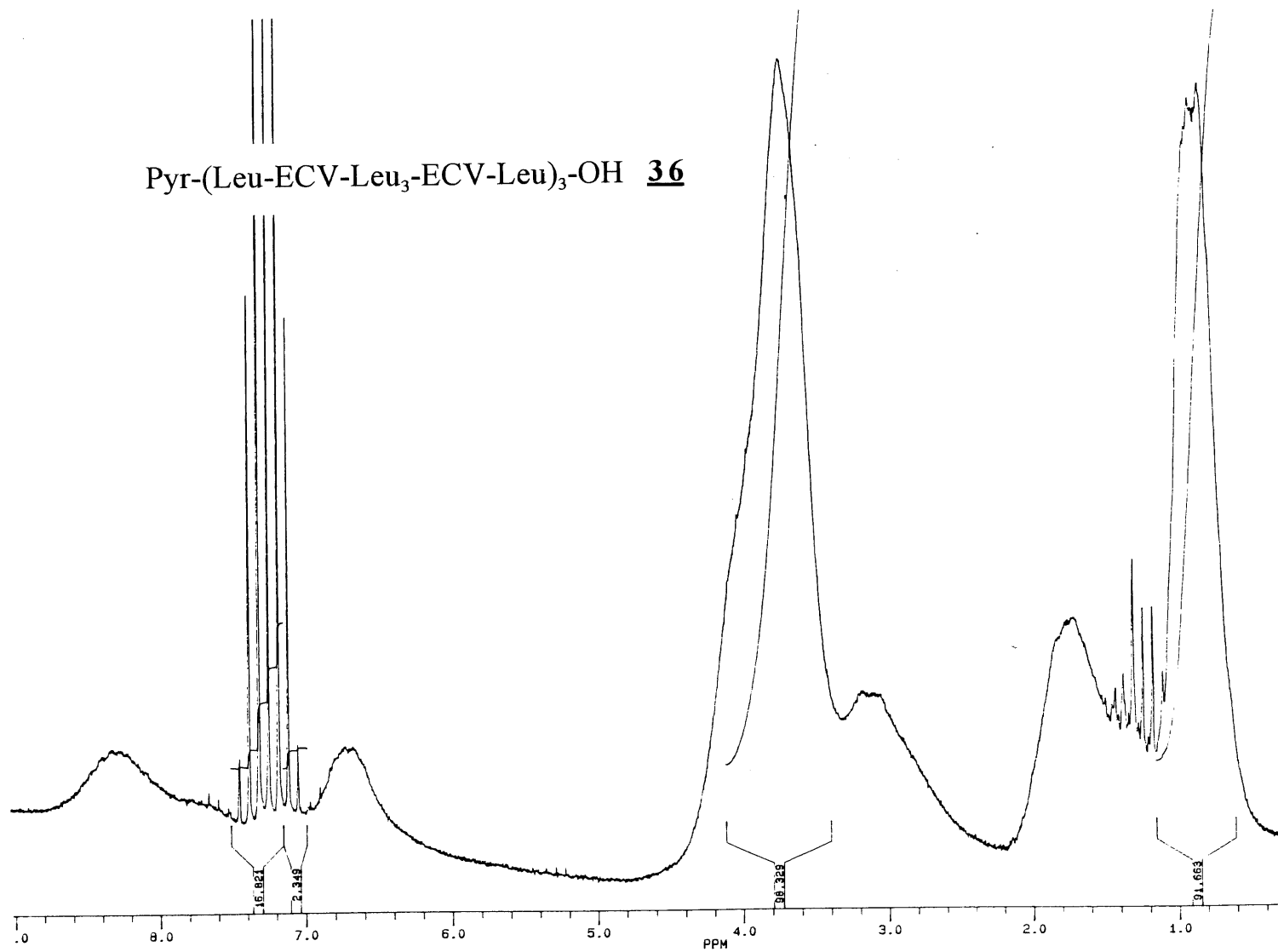
H-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-EDA **34**



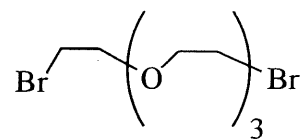
H-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-Gly 35



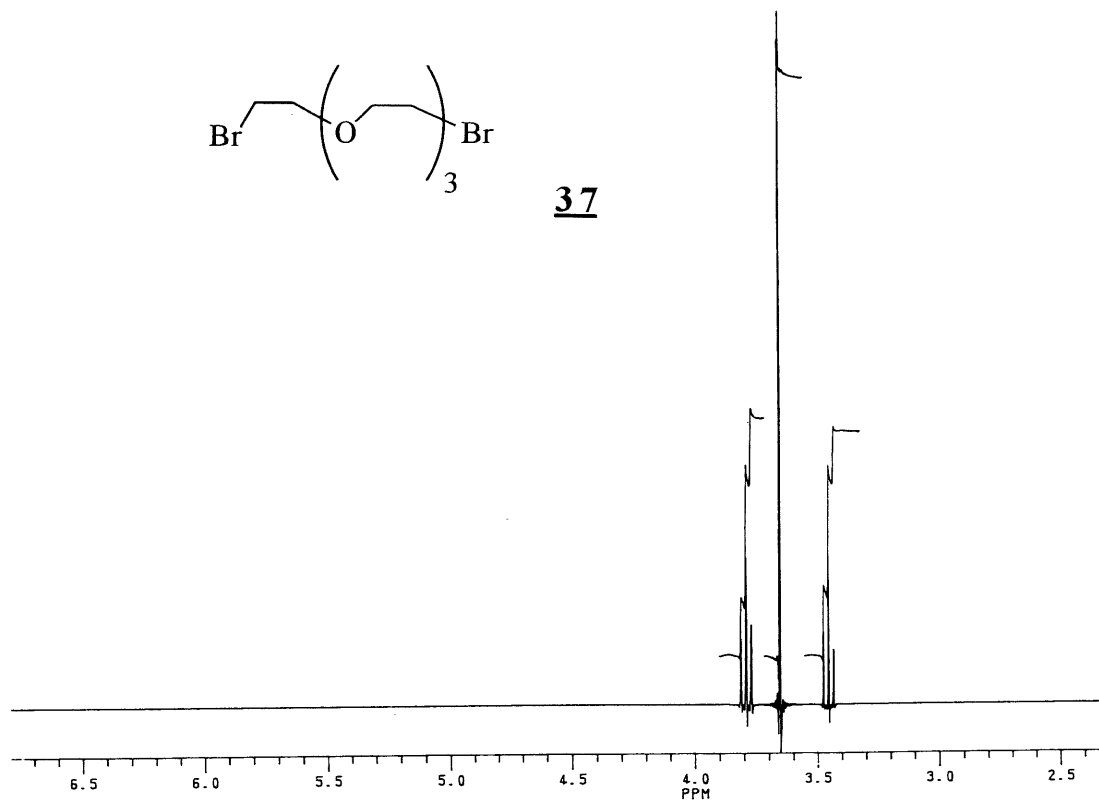
Pyr-(Leu-ECV-Leu<sub>3</sub>-ECV-Leu)<sub>3</sub>-OH **36**

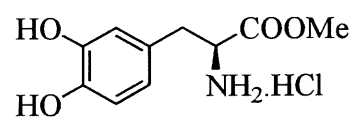




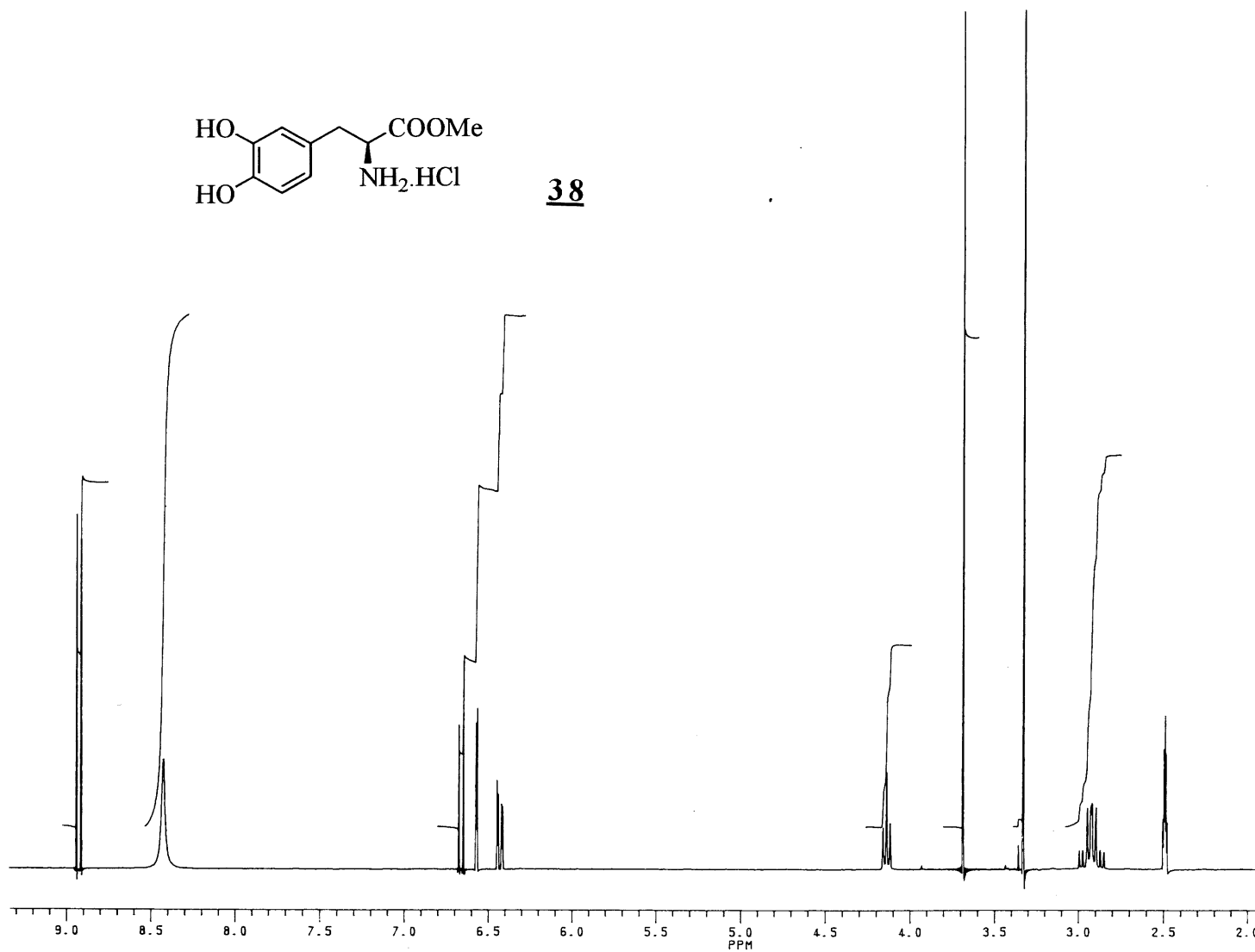


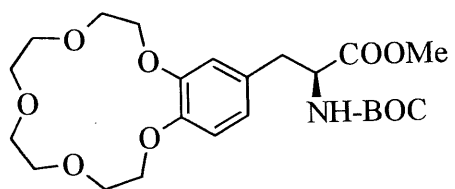
37



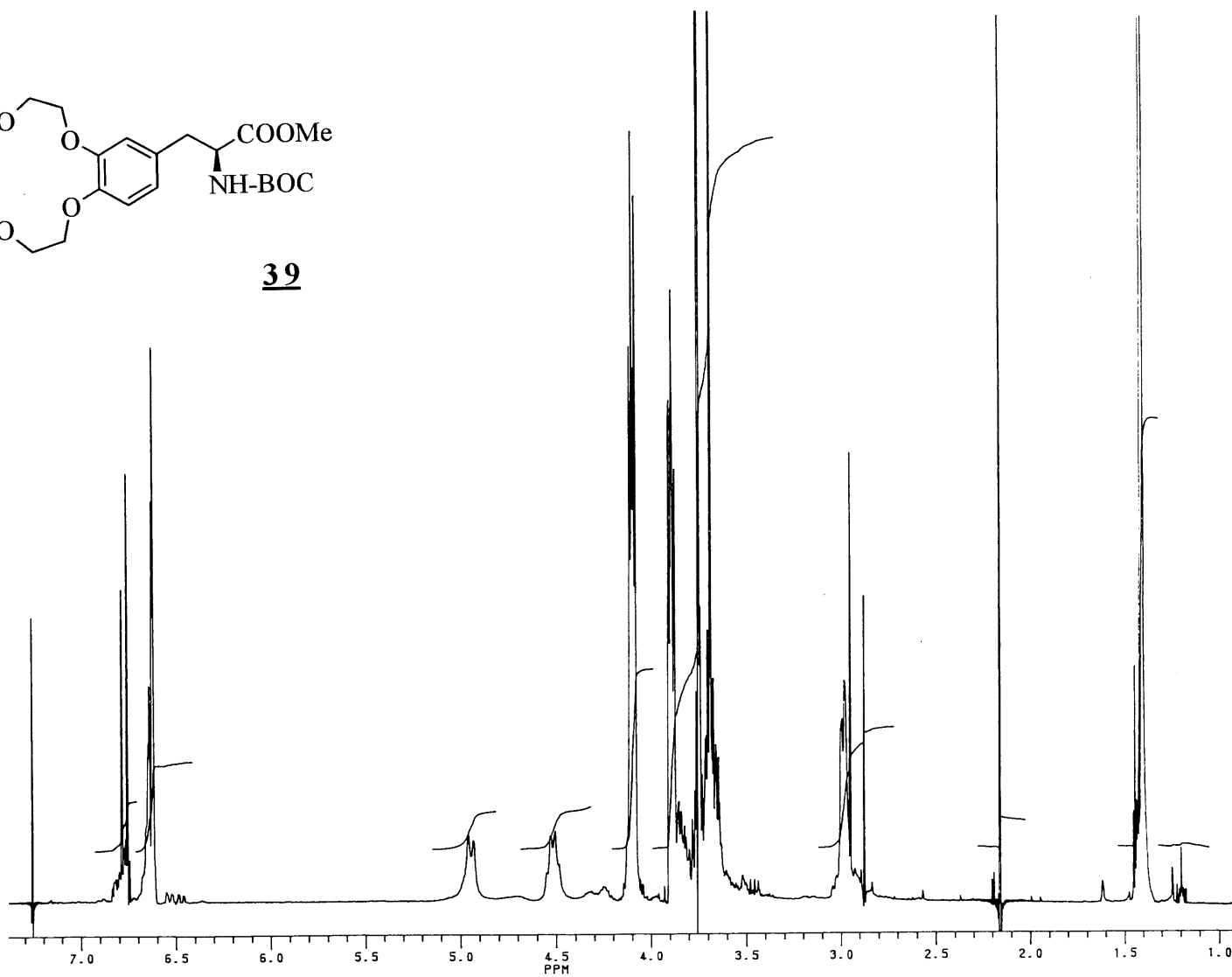


38

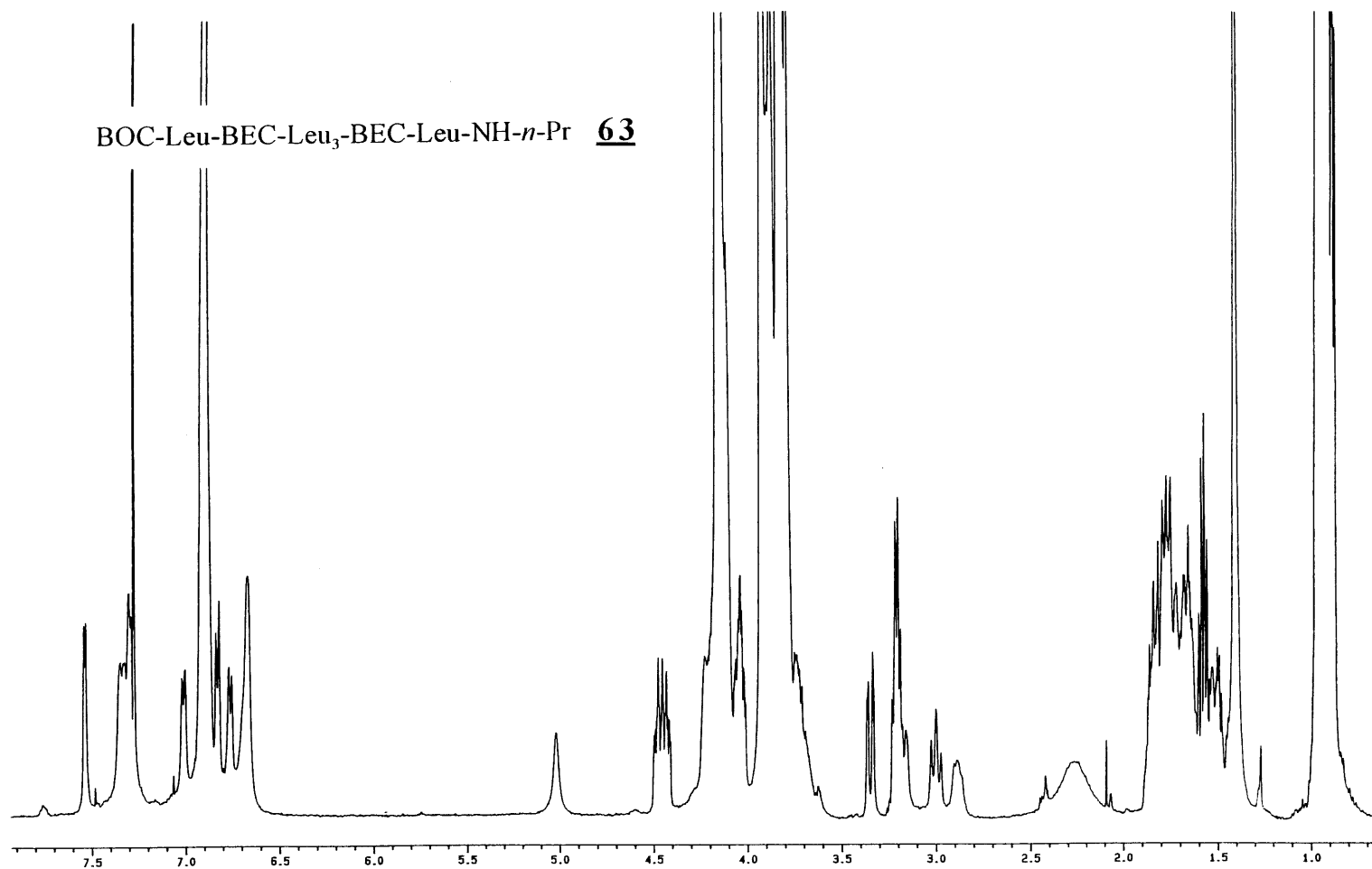




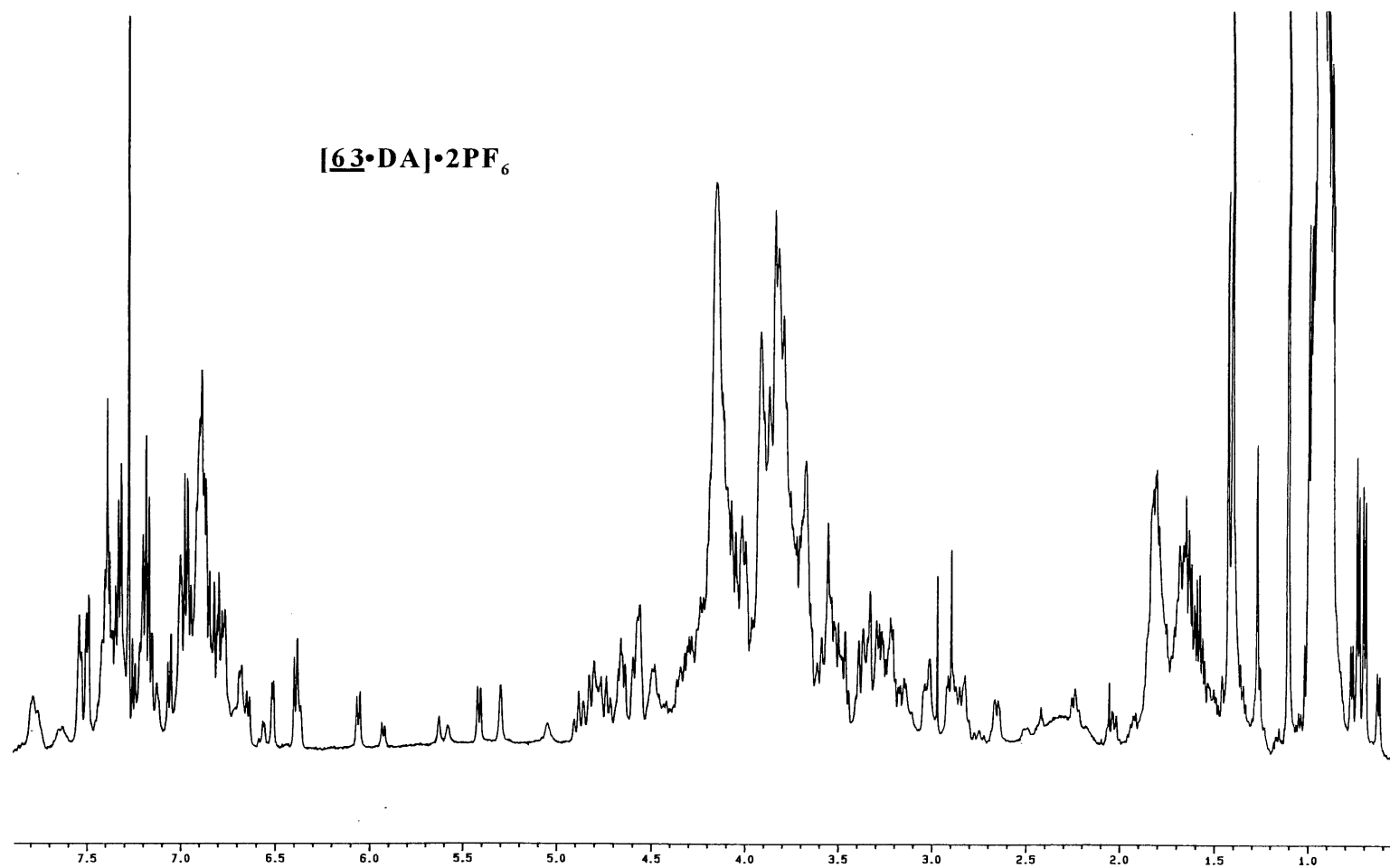
**39**



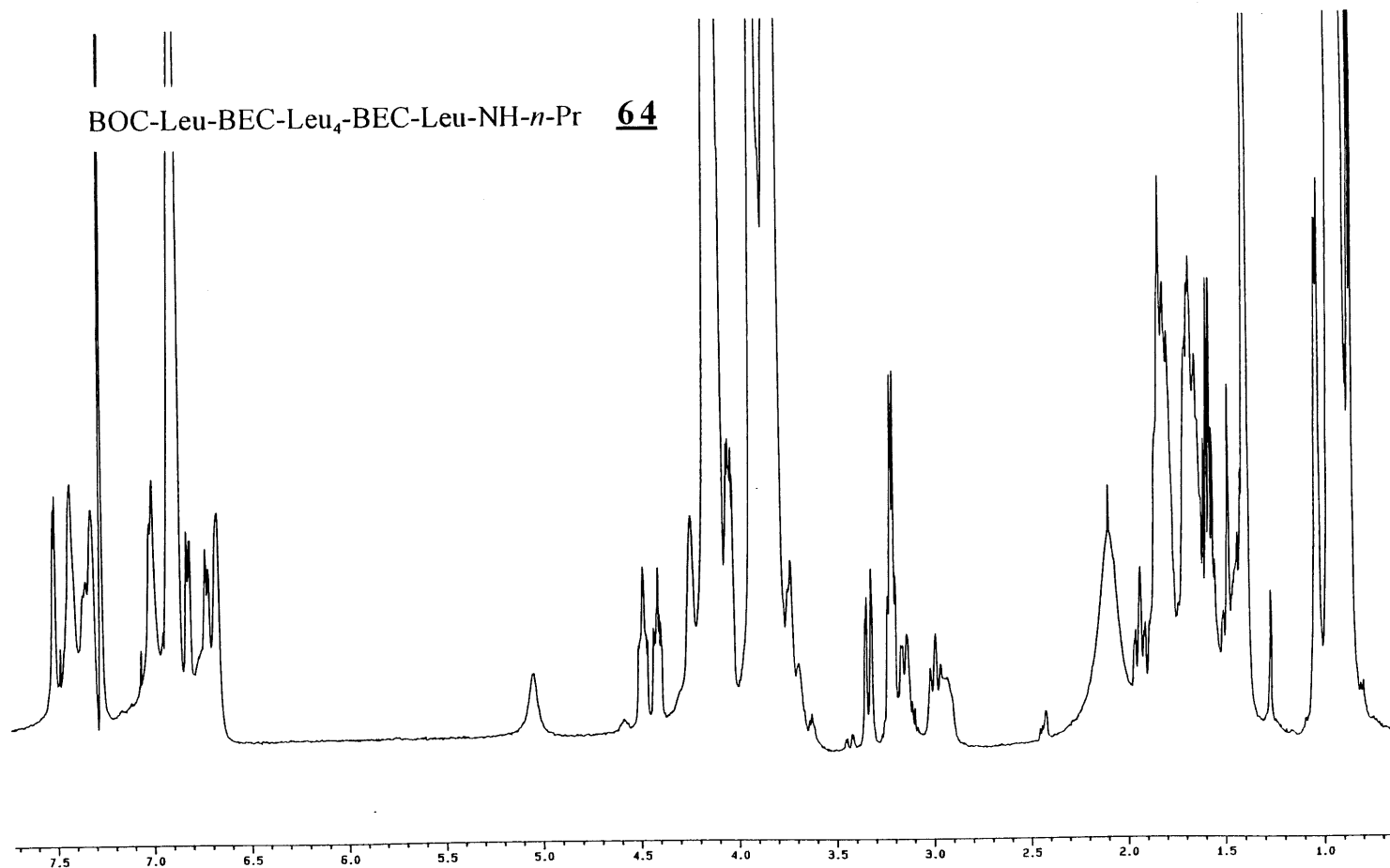
BOC-Leu-BEC-Leu<sub>3</sub>-BEC-Leu-NH-*n*-Pr **63**



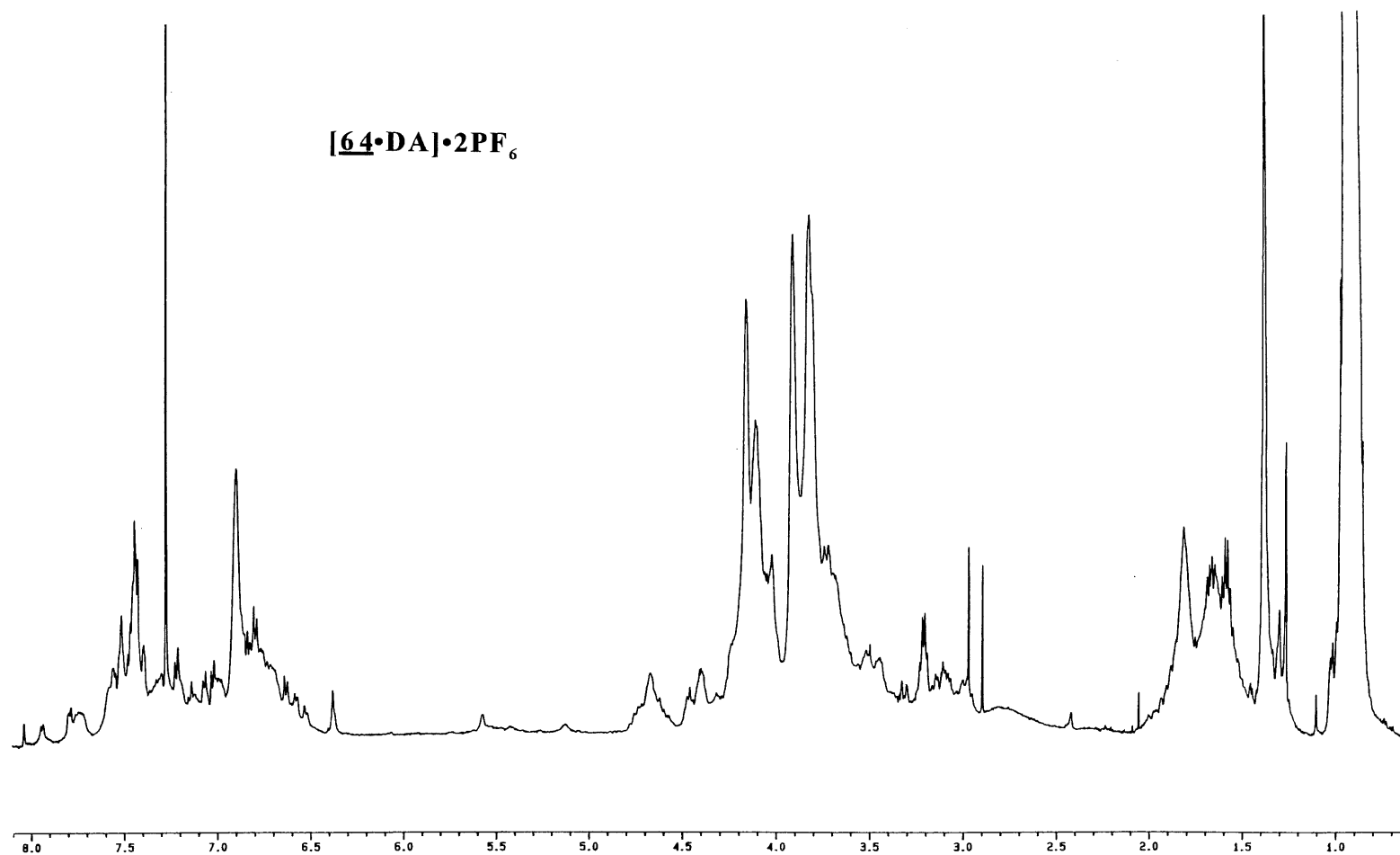
**[63•DA]•2PF<sub>6</sub>**



BOC-Leu-BEC-Leu<sub>4</sub>-BEC-Leu-NH-*n*-Pr 64

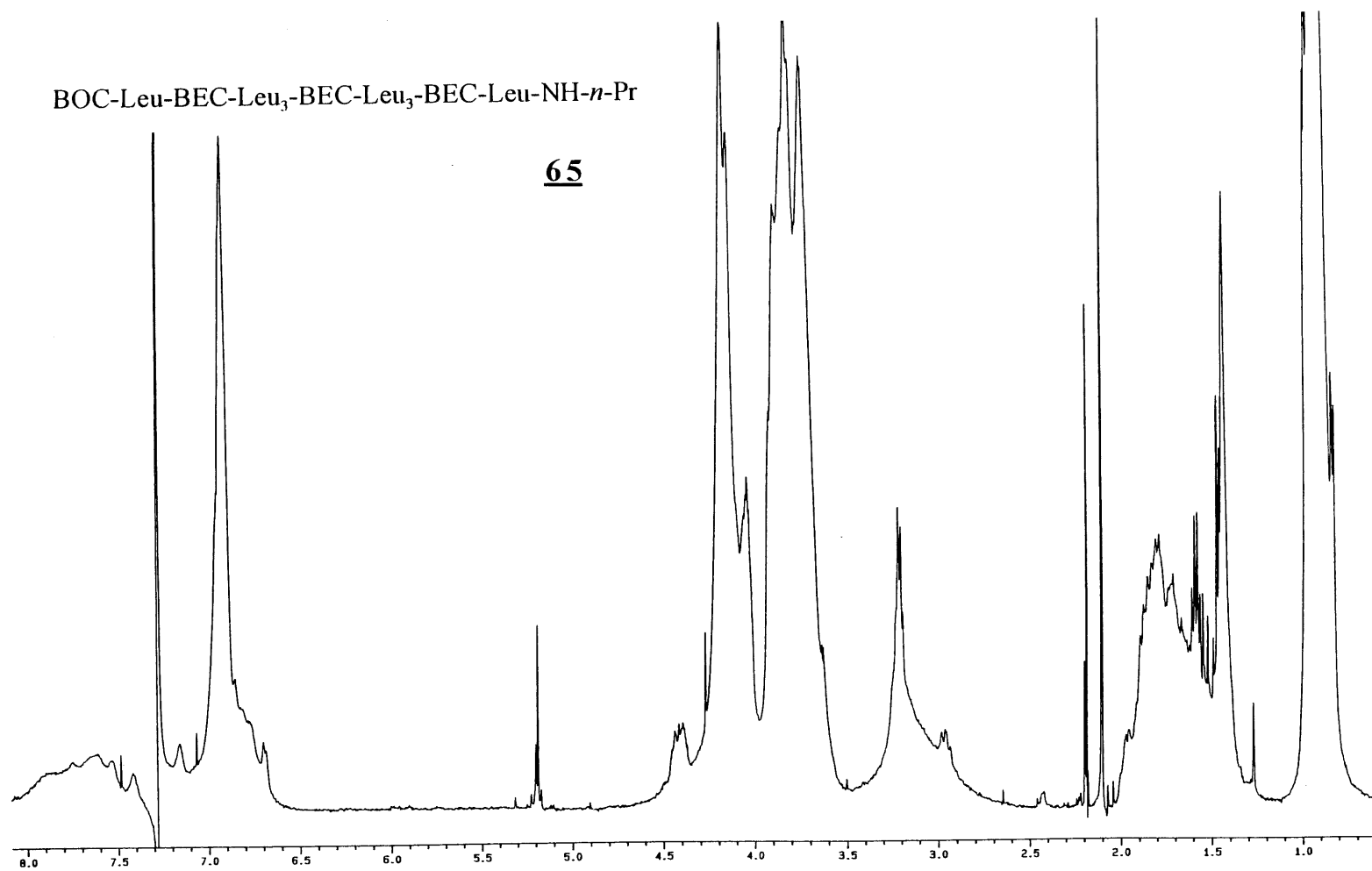


**[64•DA]•2PF<sub>6</sub>**



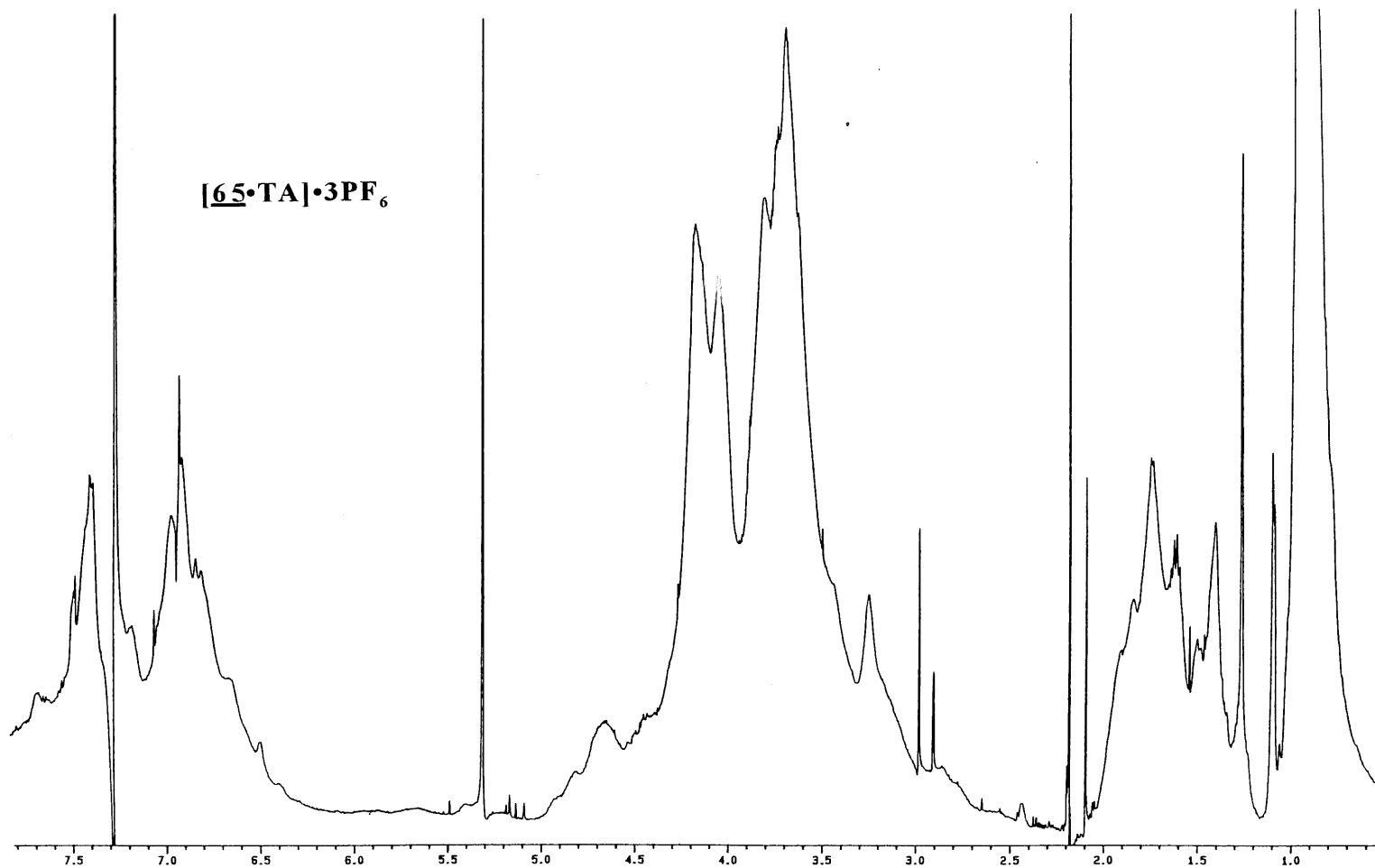
BOC-Leu-BEC-Leu<sub>3</sub>-BEC-Leu<sub>3</sub>-BEC-Leu-NH-*n*-Pr

65



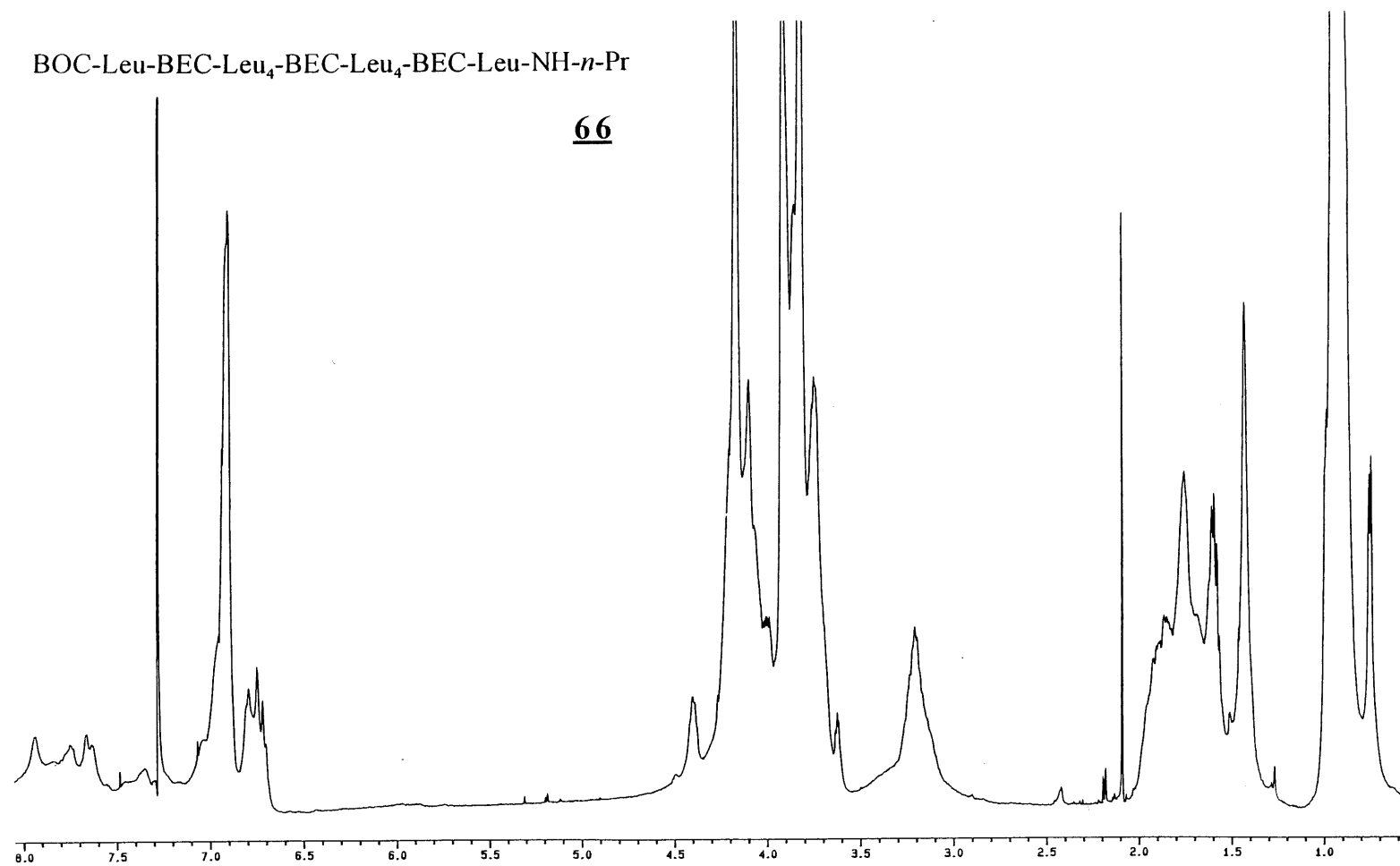


[65·TA]·3PF<sub>6</sub>

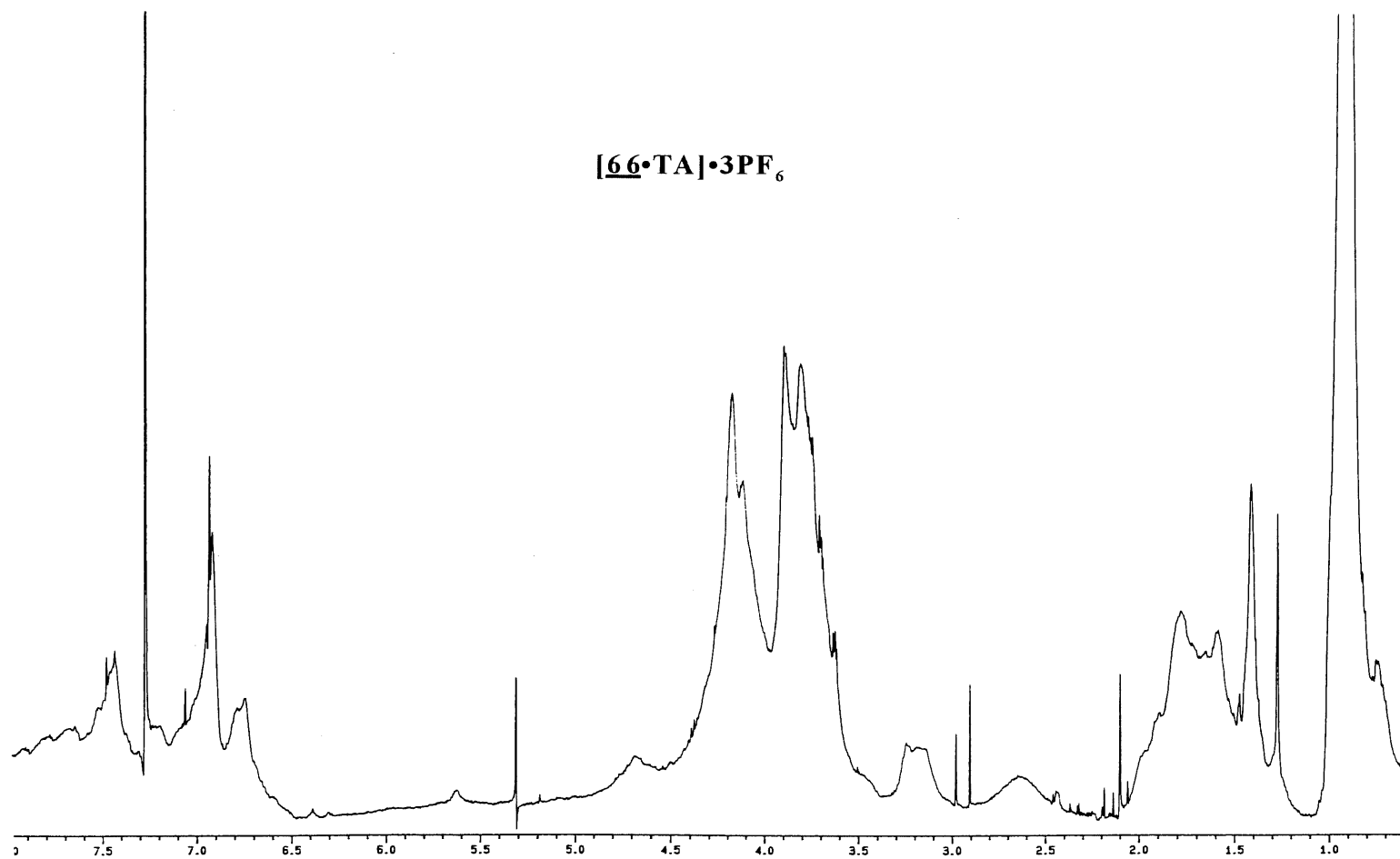


BOC-Leu-BEC-Leu<sub>4</sub>-BEC-Leu<sub>4</sub>-BEC-Leu-NH-*n*-Pr

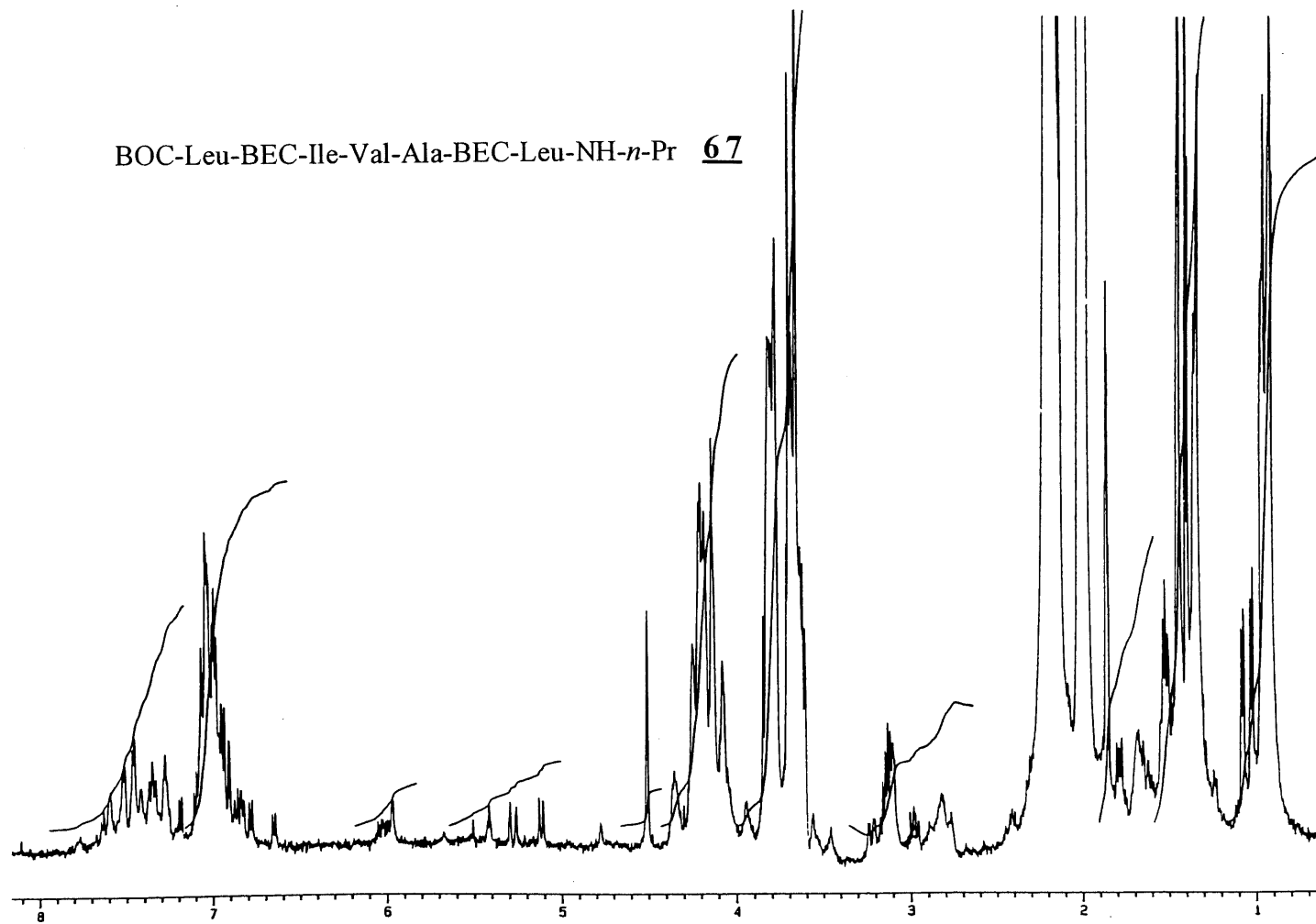
66



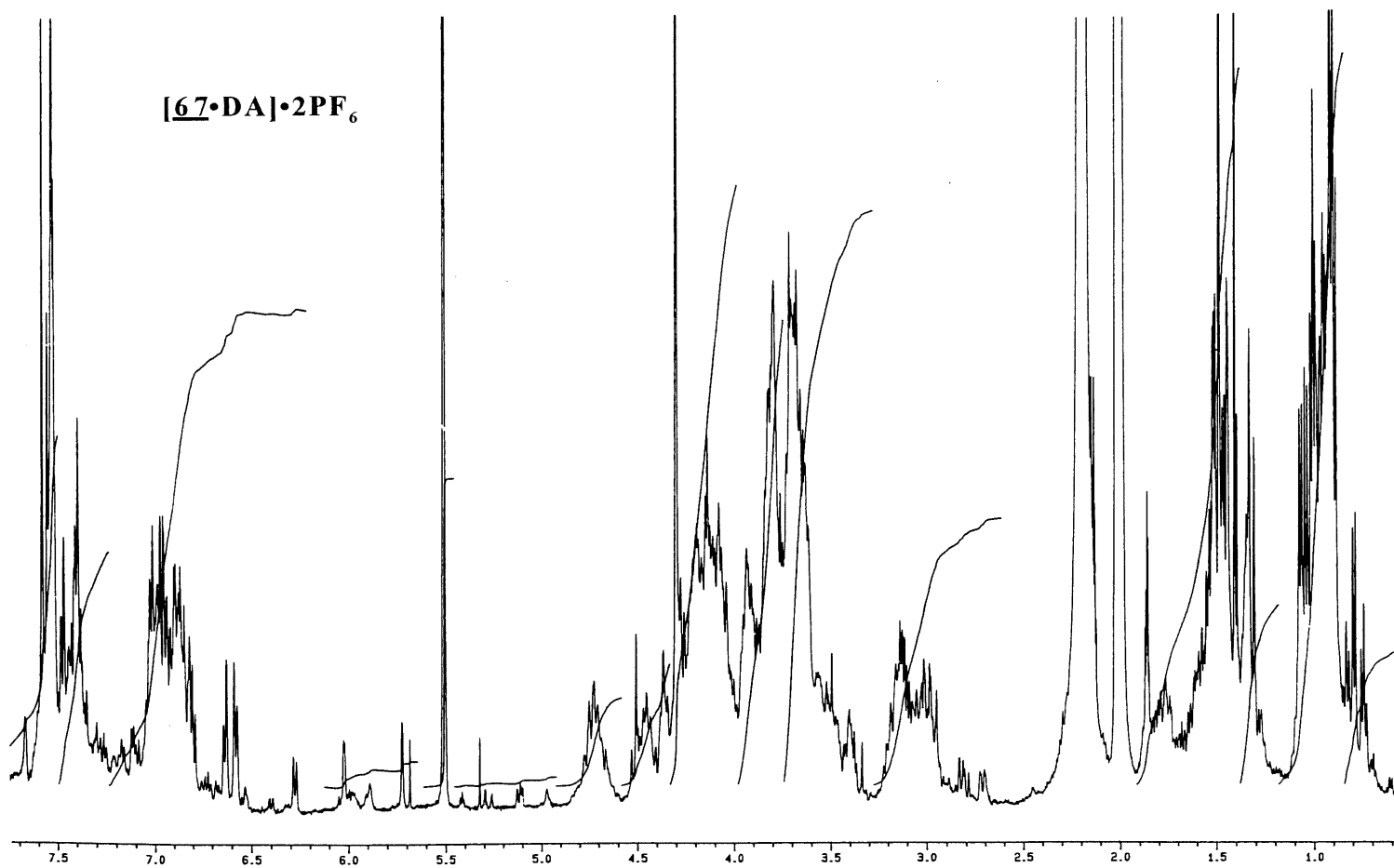
[66•TA]•3PF<sub>6</sub>



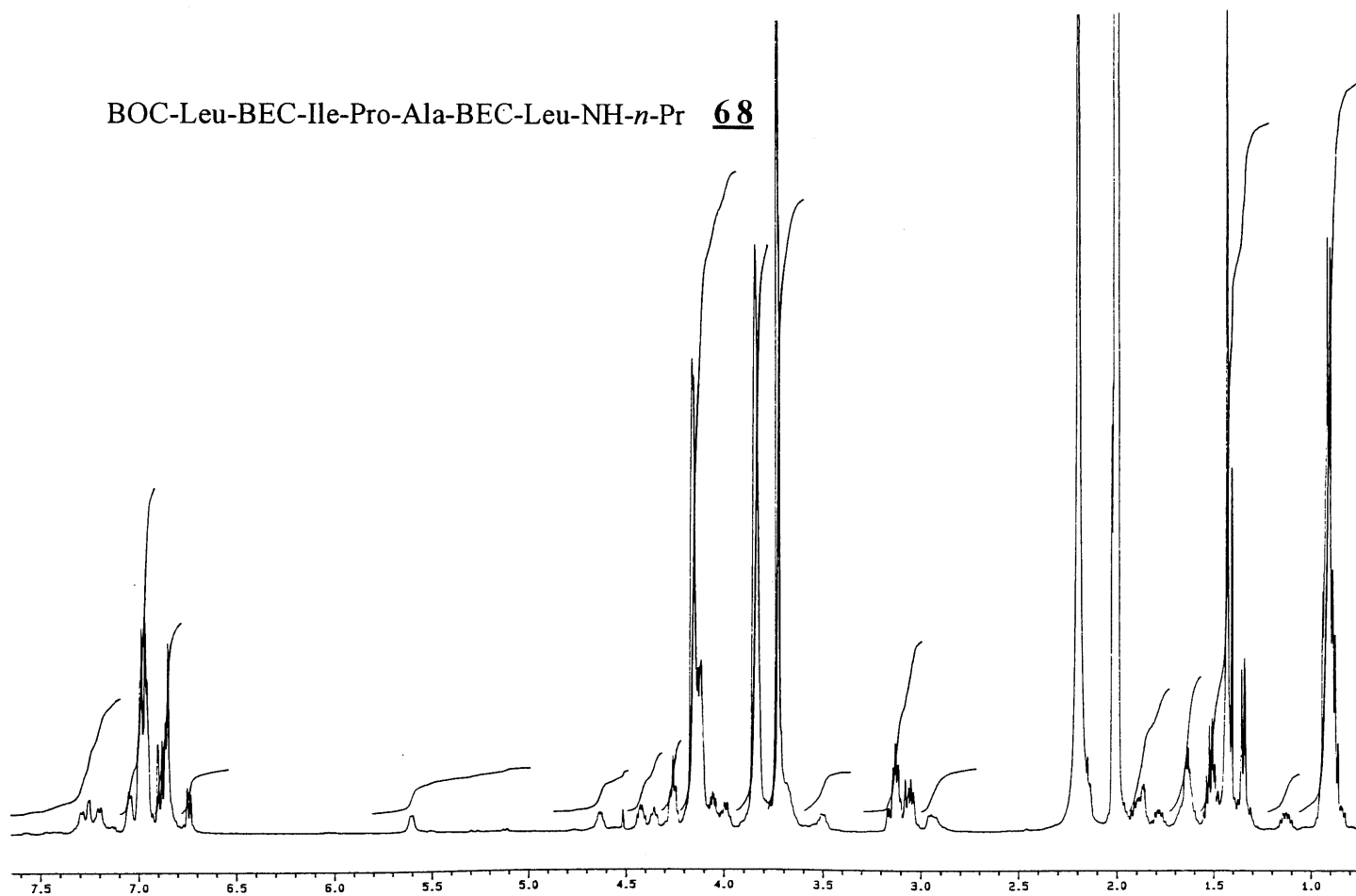
BOC-Leu-BEC-Ile-Val-Ala-BEC-Leu-NH-*n*-Pr 67



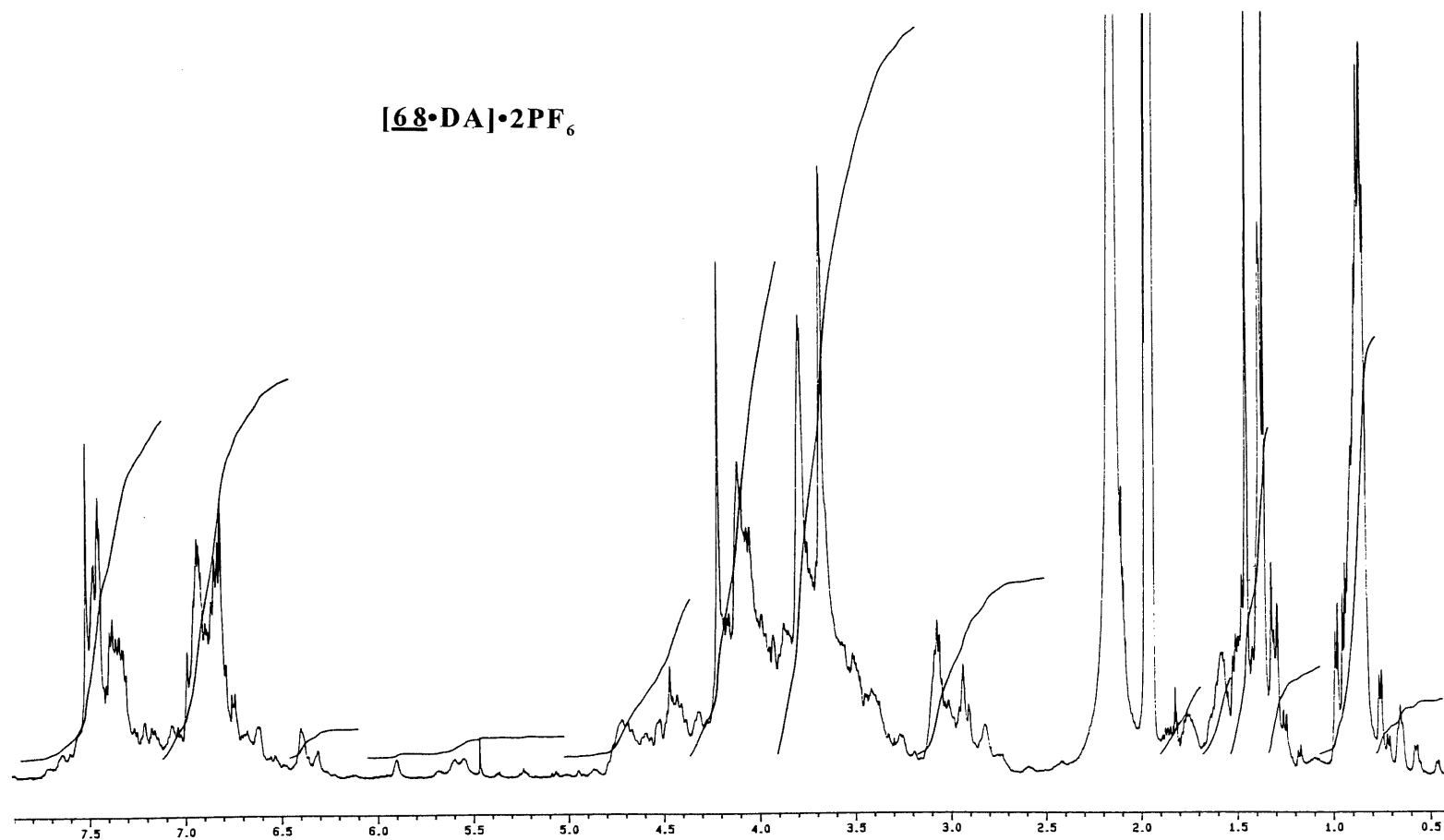
**[67·DA]·2PF<sub>6</sub>**

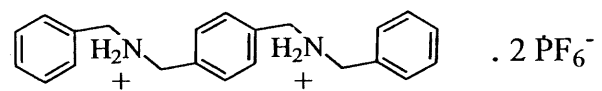


BOC-Leu-BEC-Ile-Pro-Ala-BEC-Leu-NH-*n*-Pr **68**

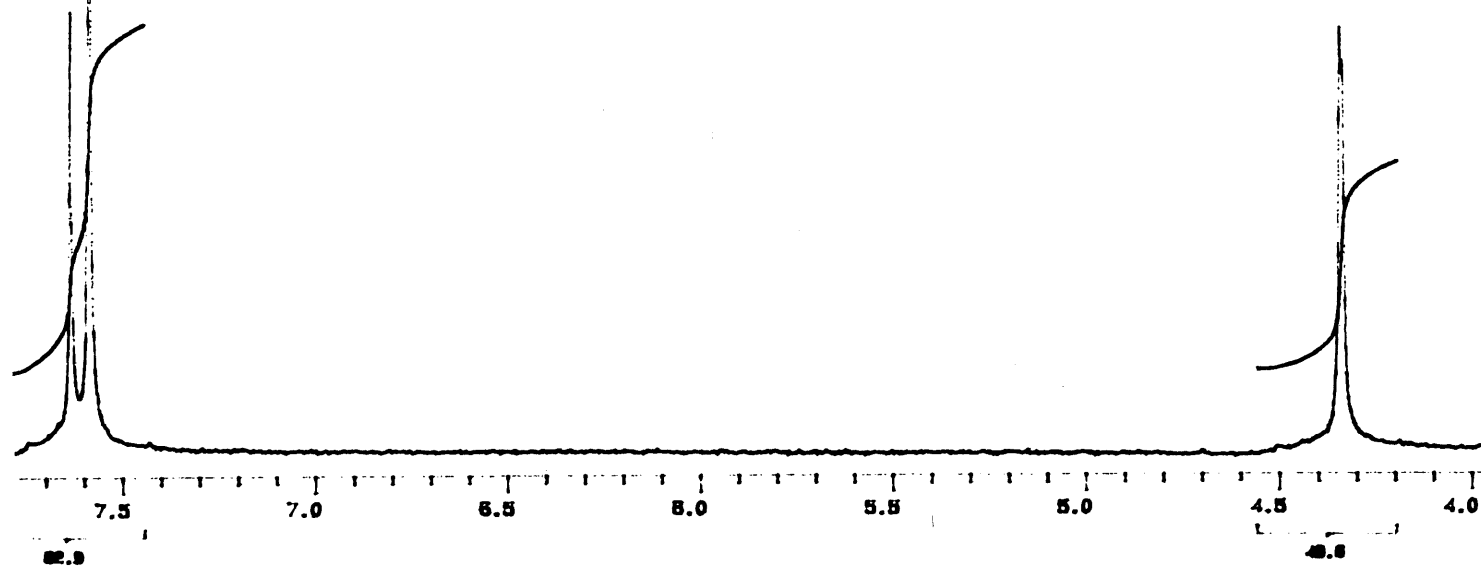


[68•DA]•2PF<sub>6</sub>

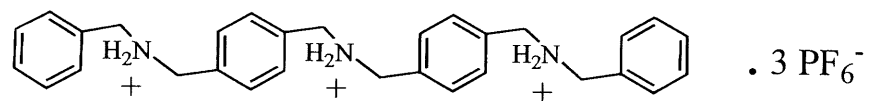




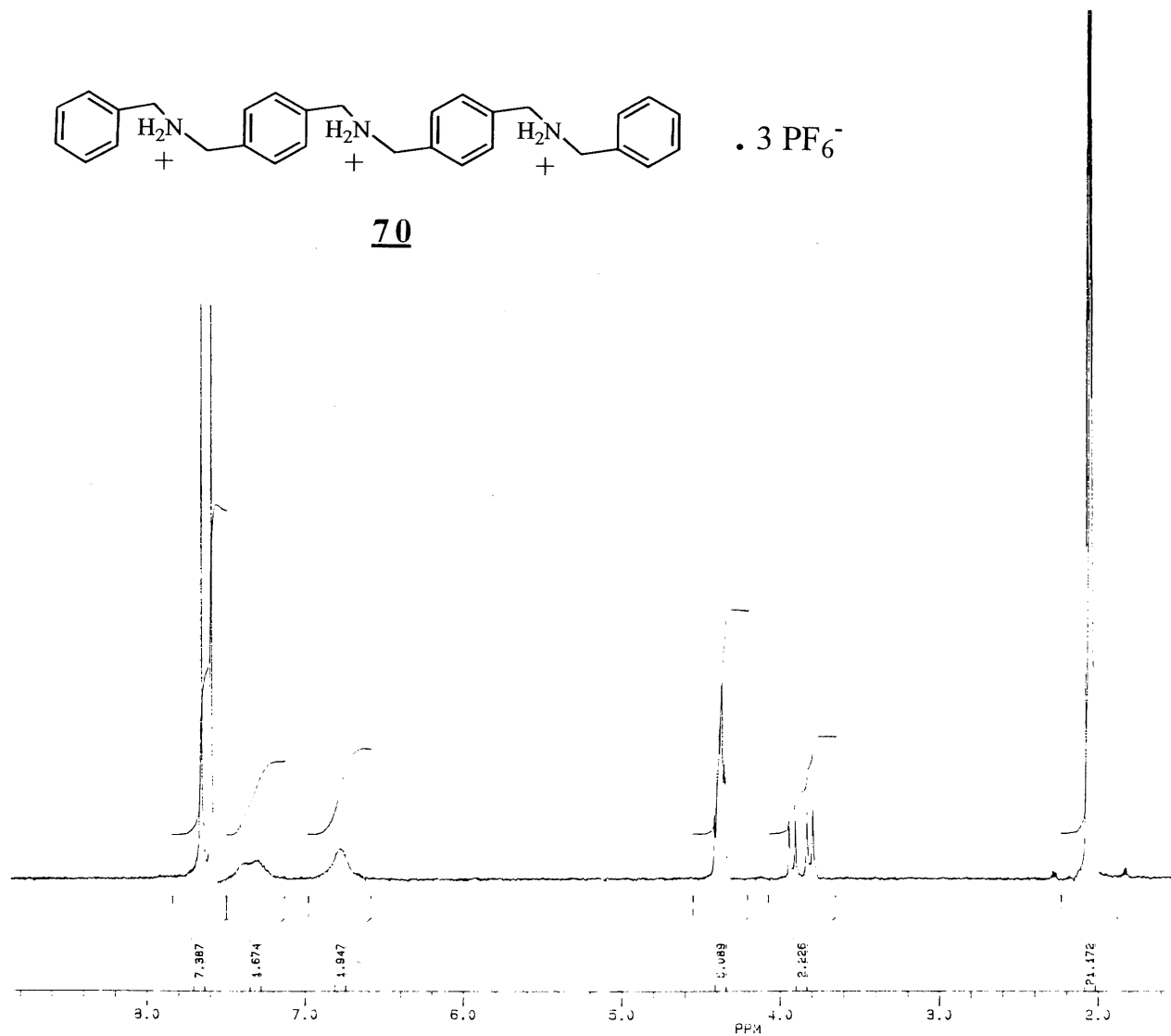
69



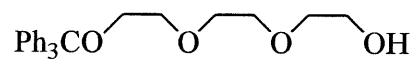




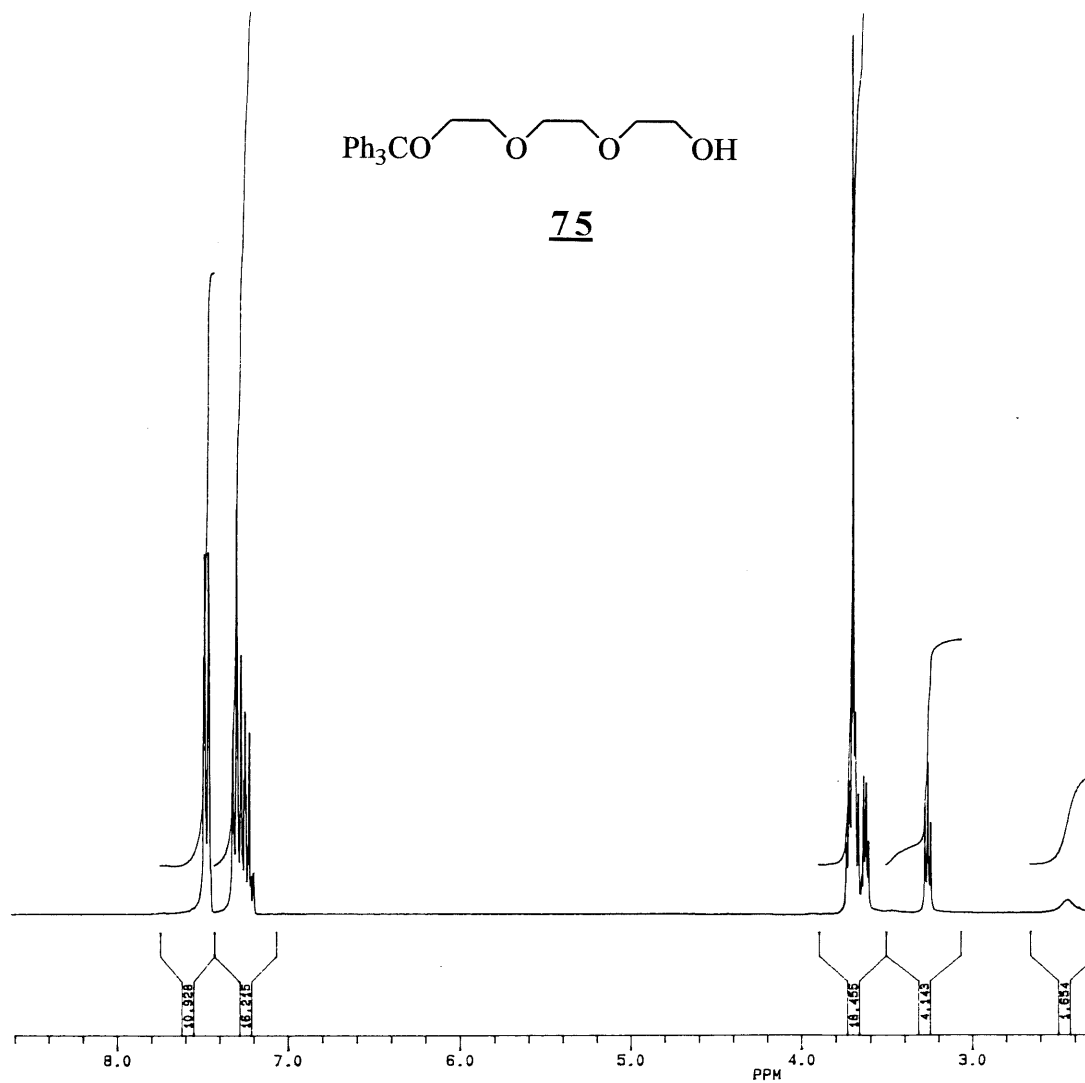
70

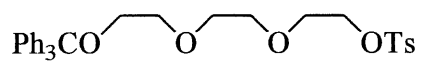




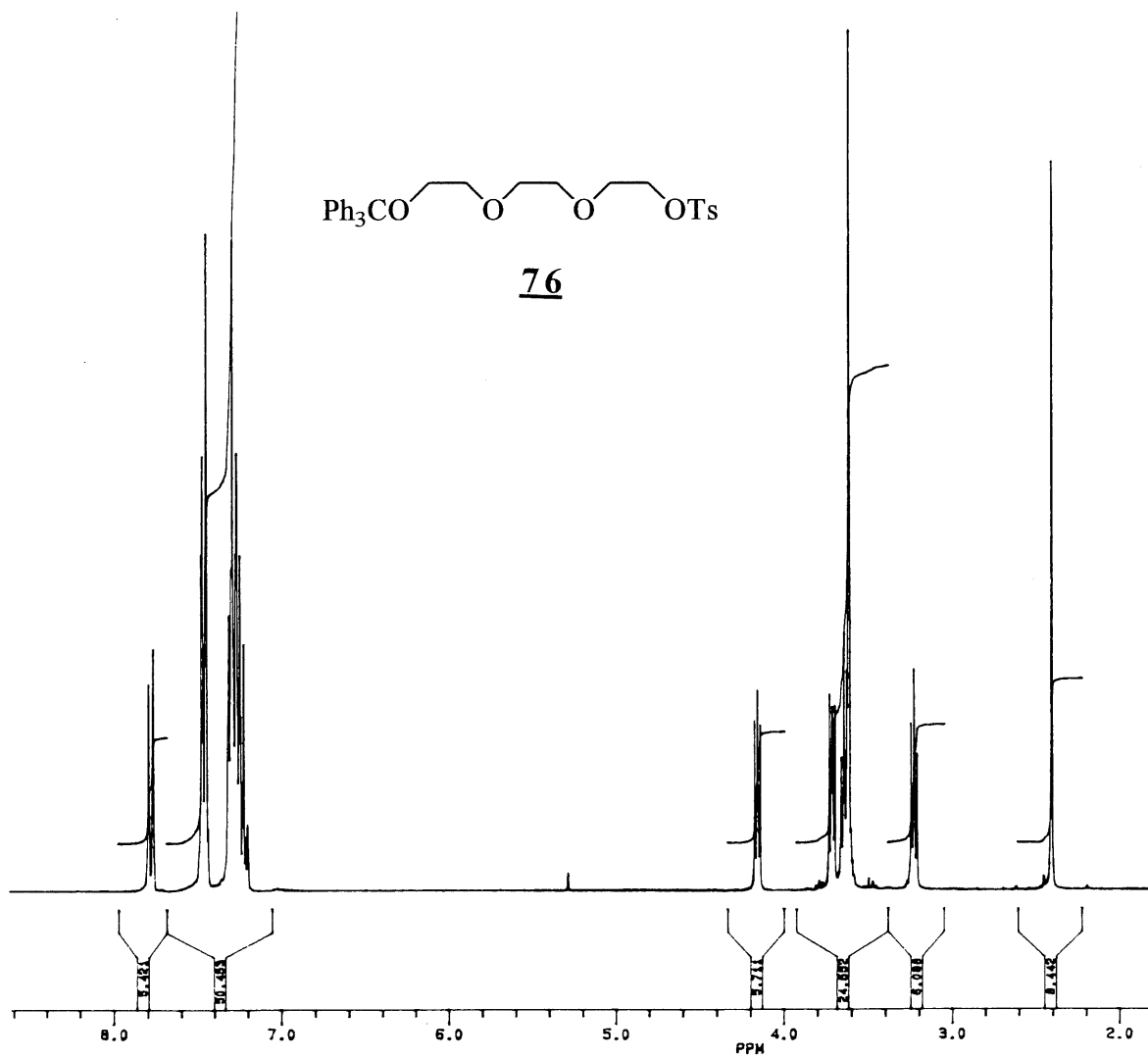


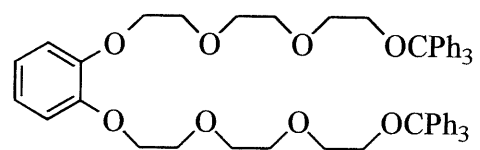
75



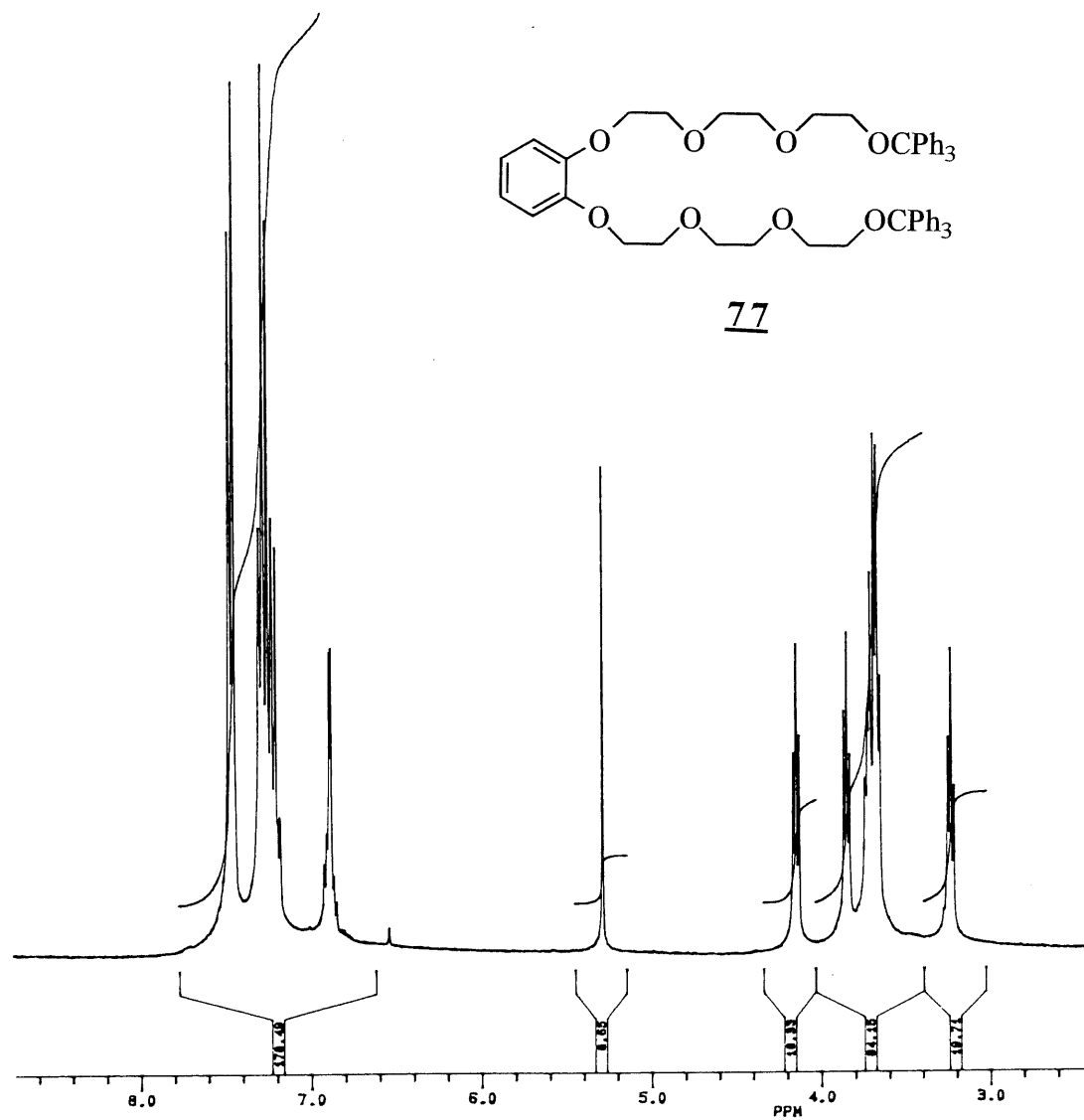


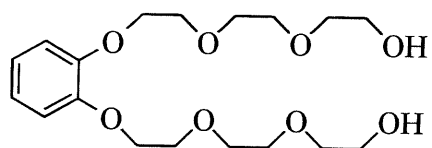
76



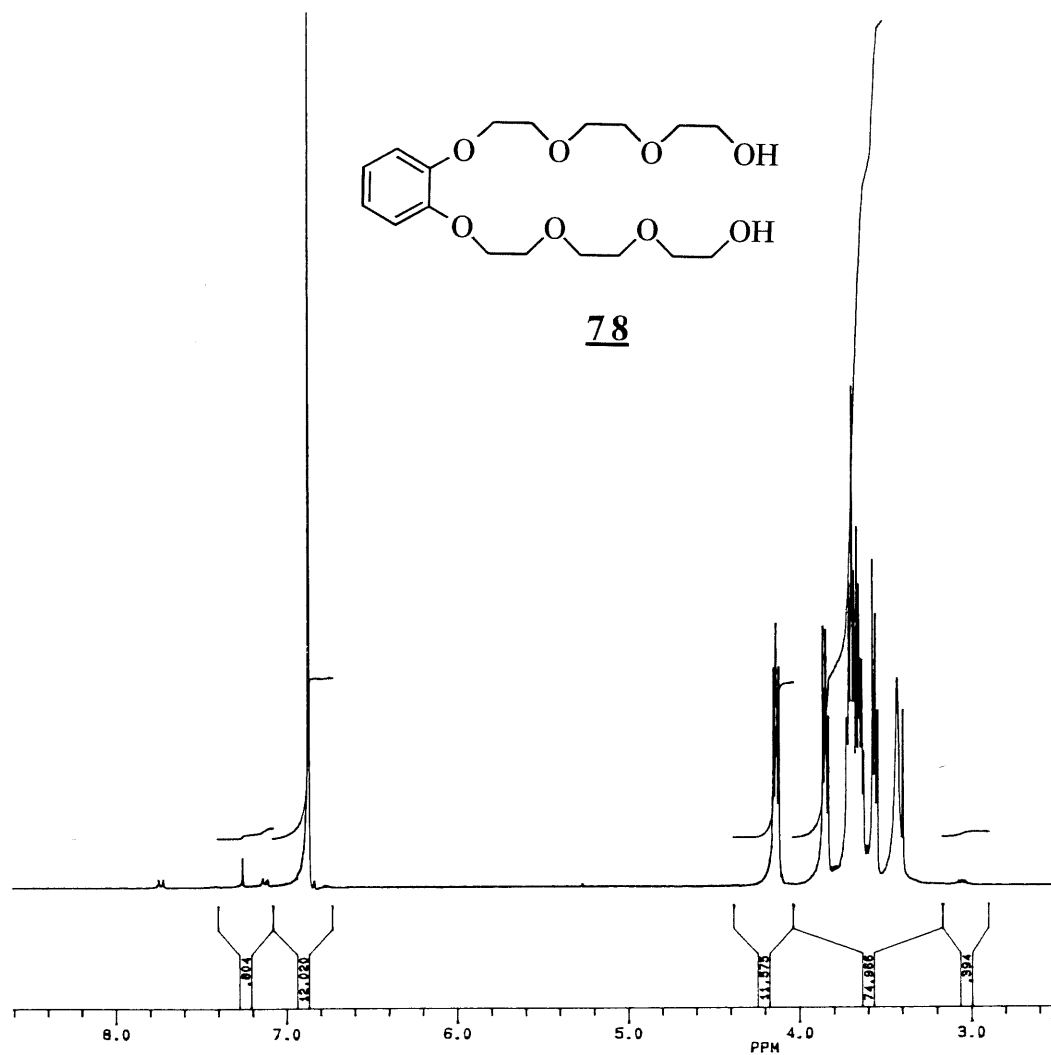


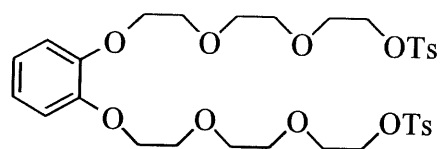
77



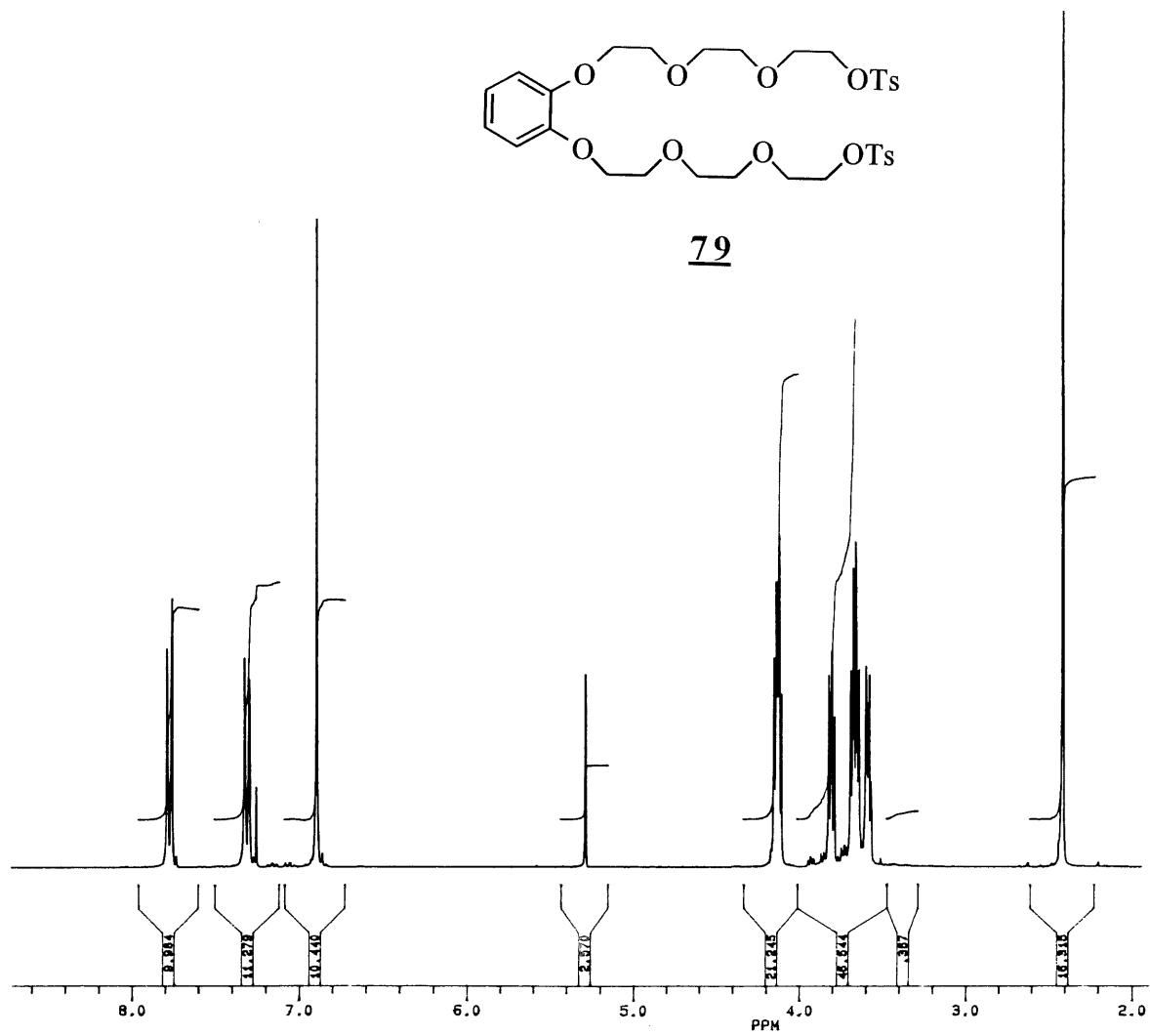


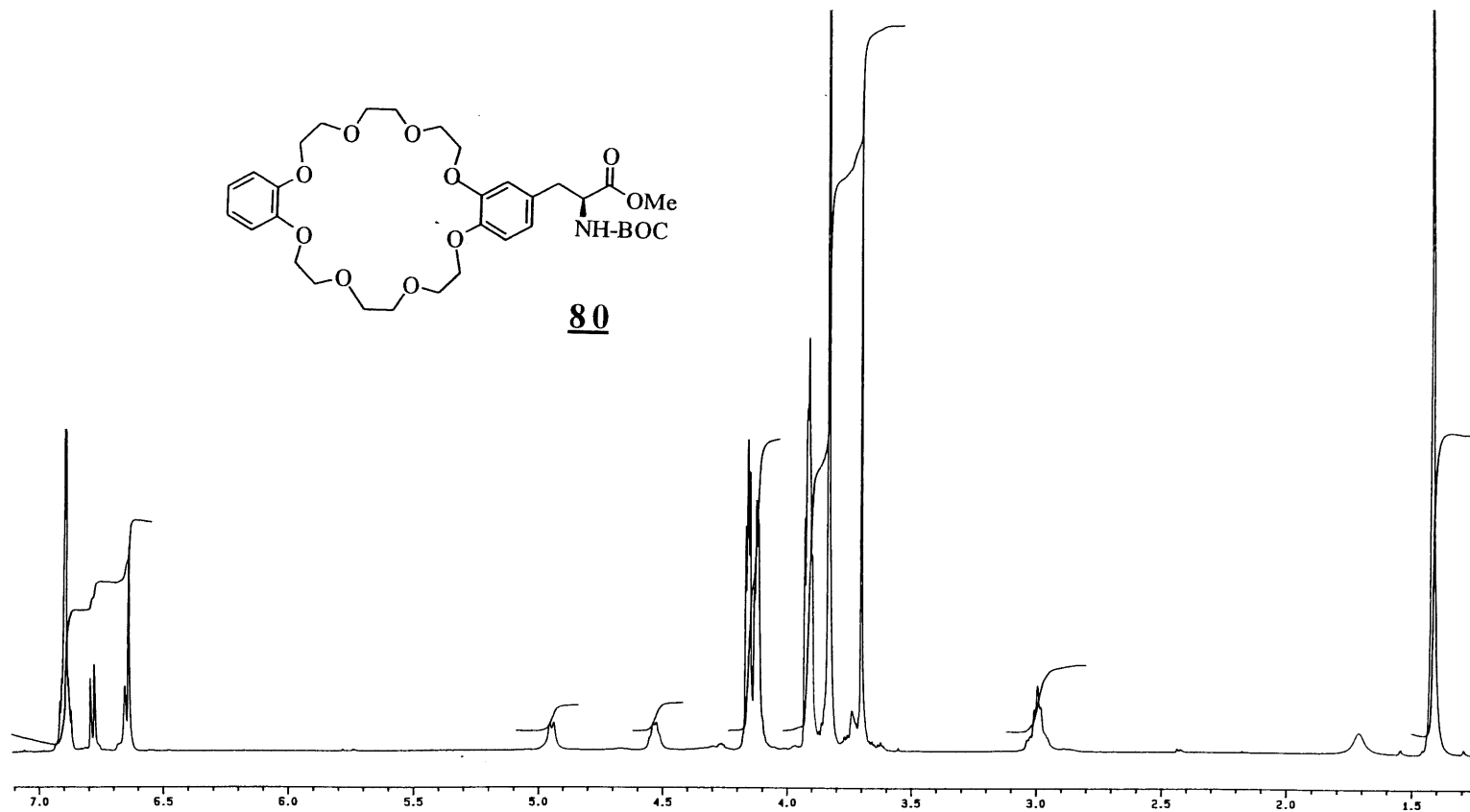
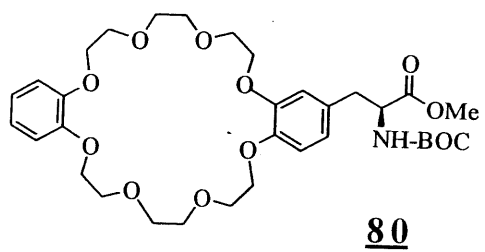
78





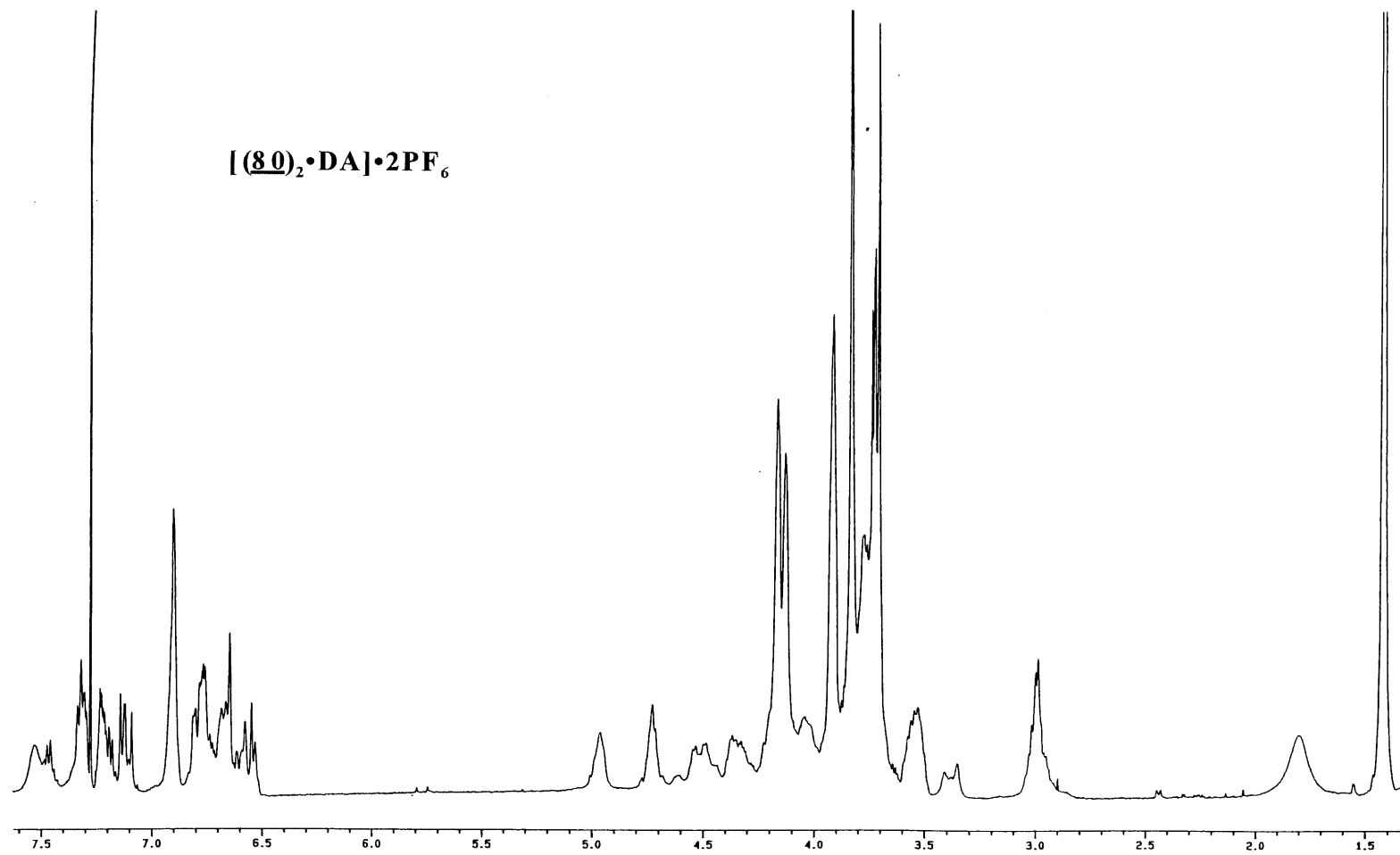
79

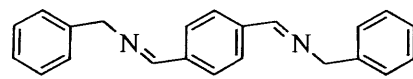
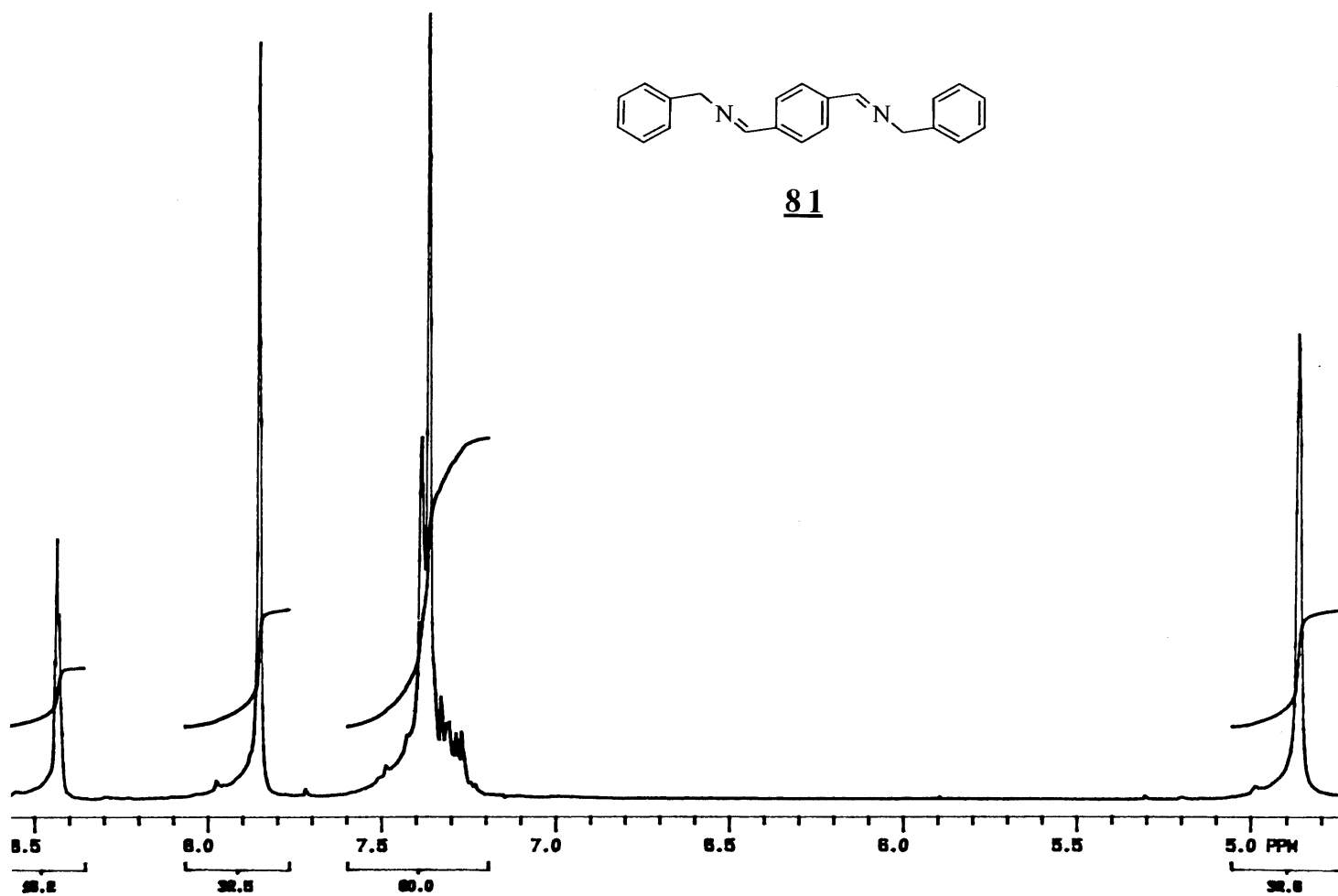


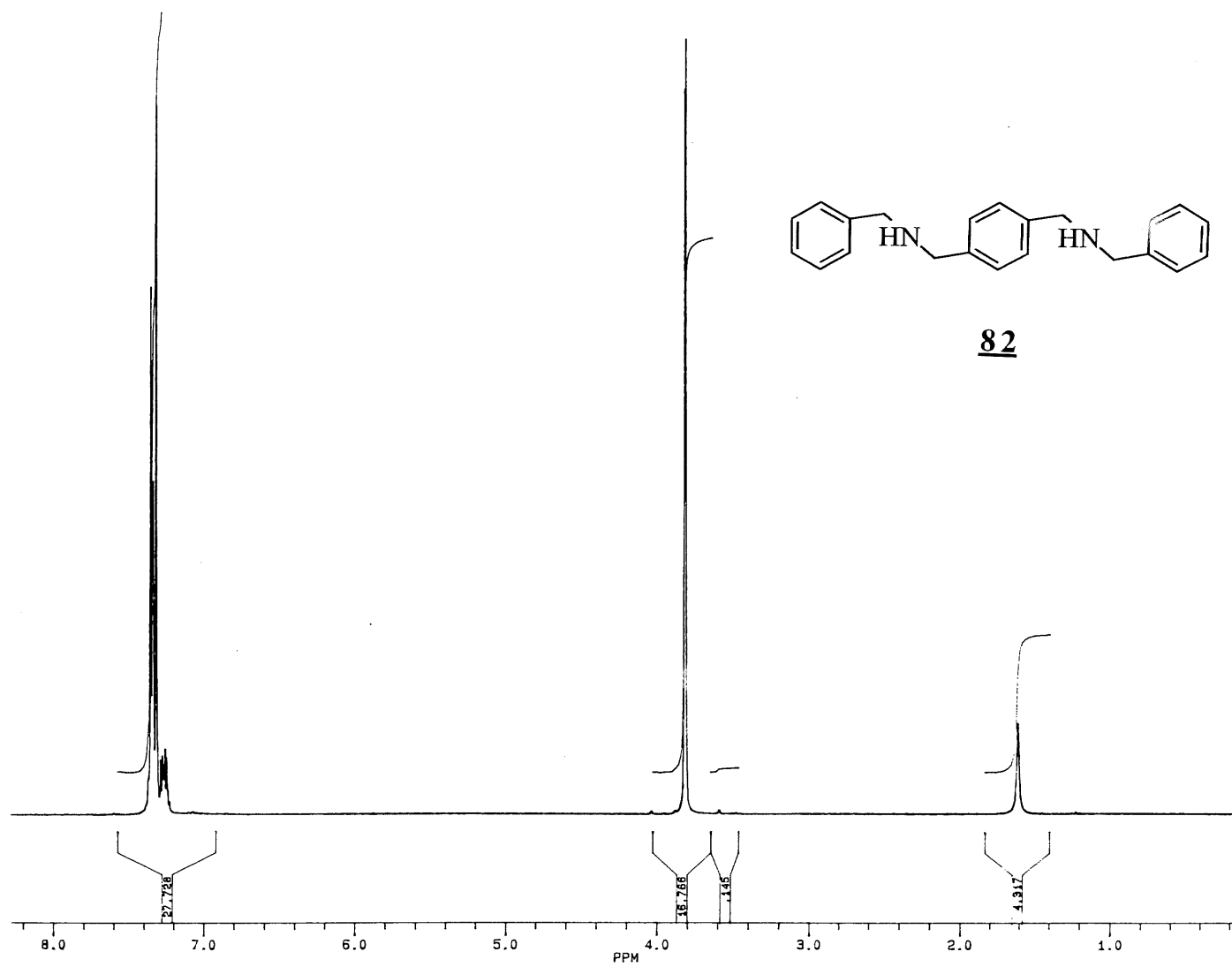


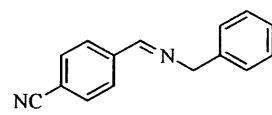
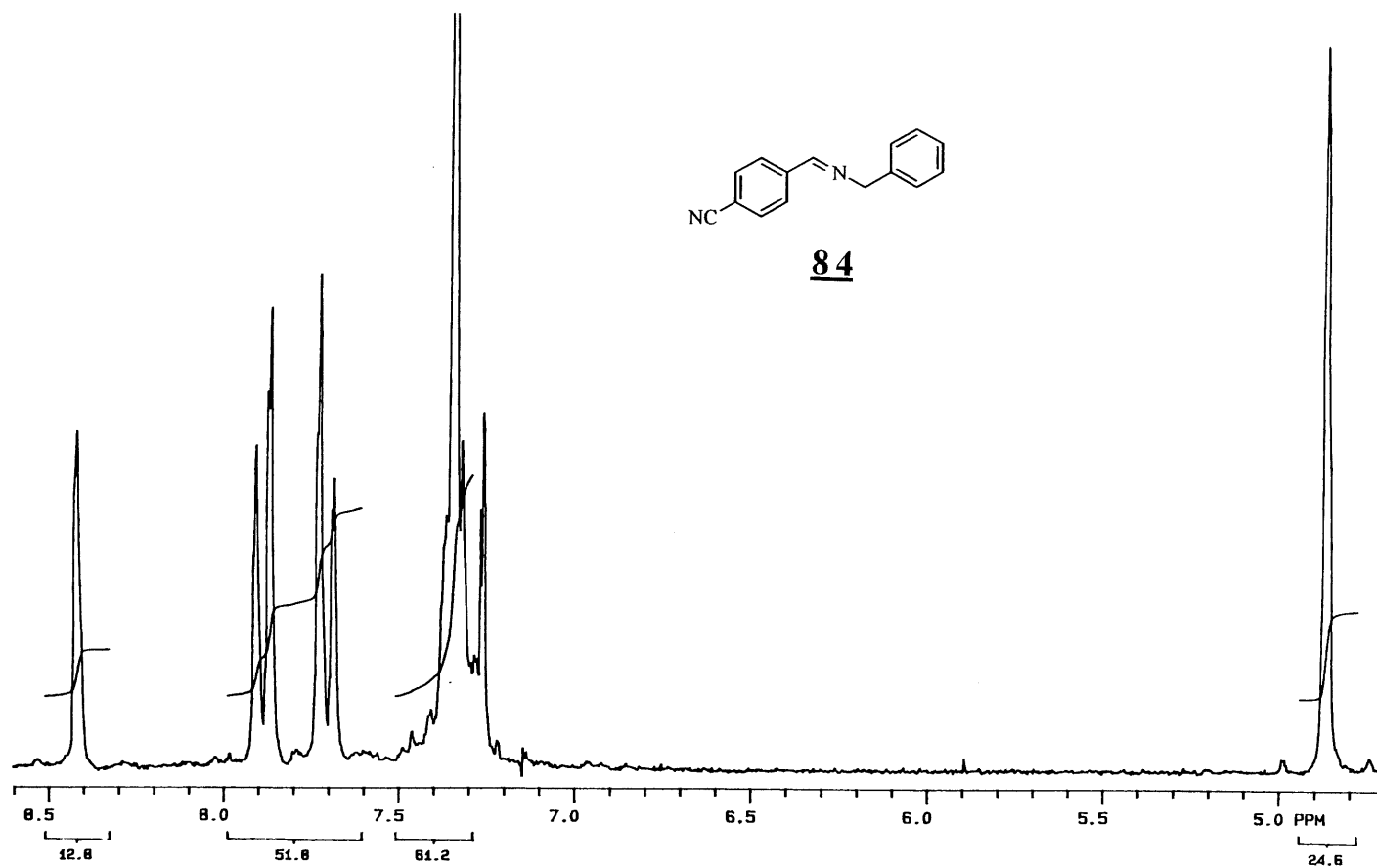


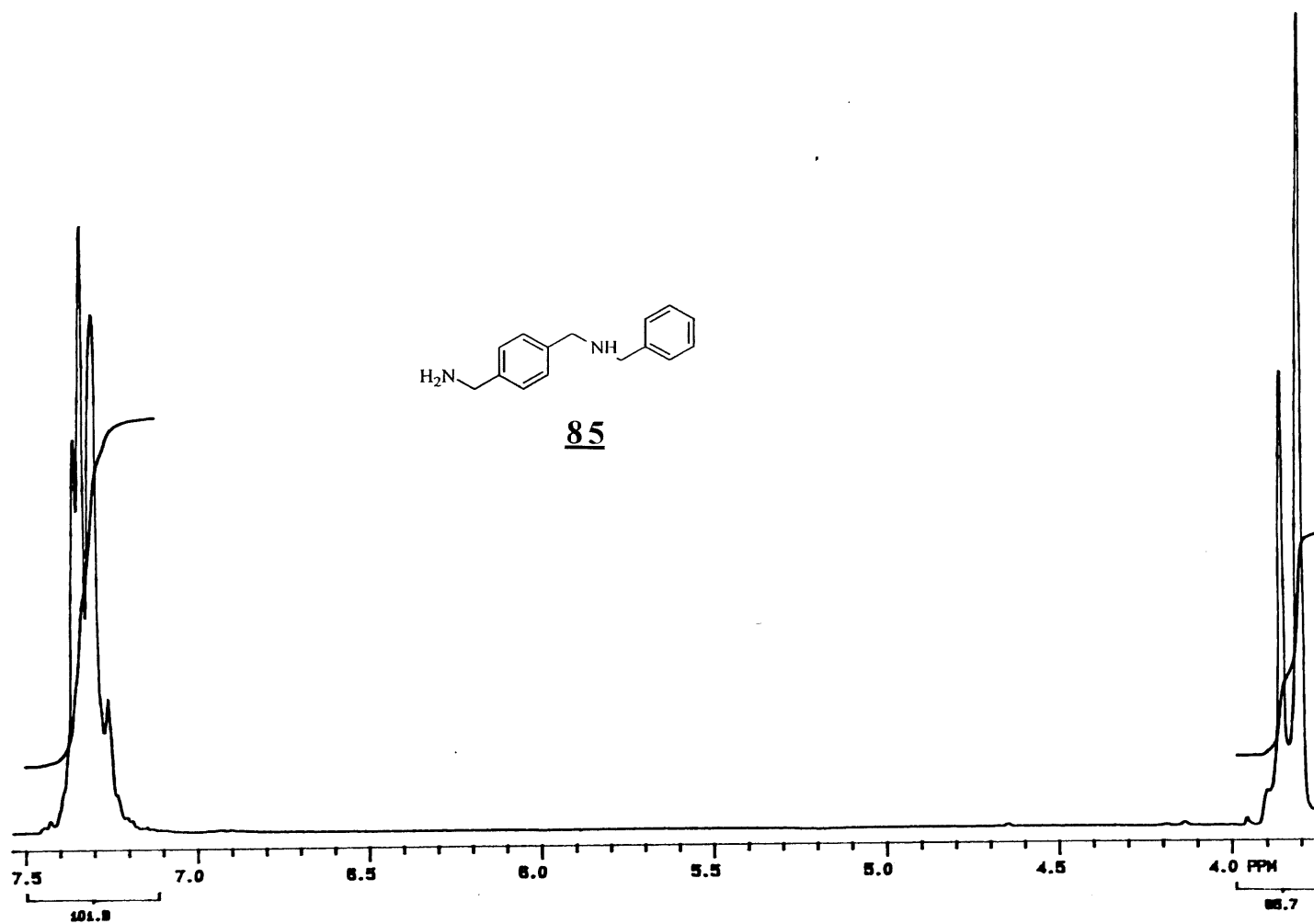
**[80]<sub>2</sub>•DA)•2PF<sub>6</sub>**

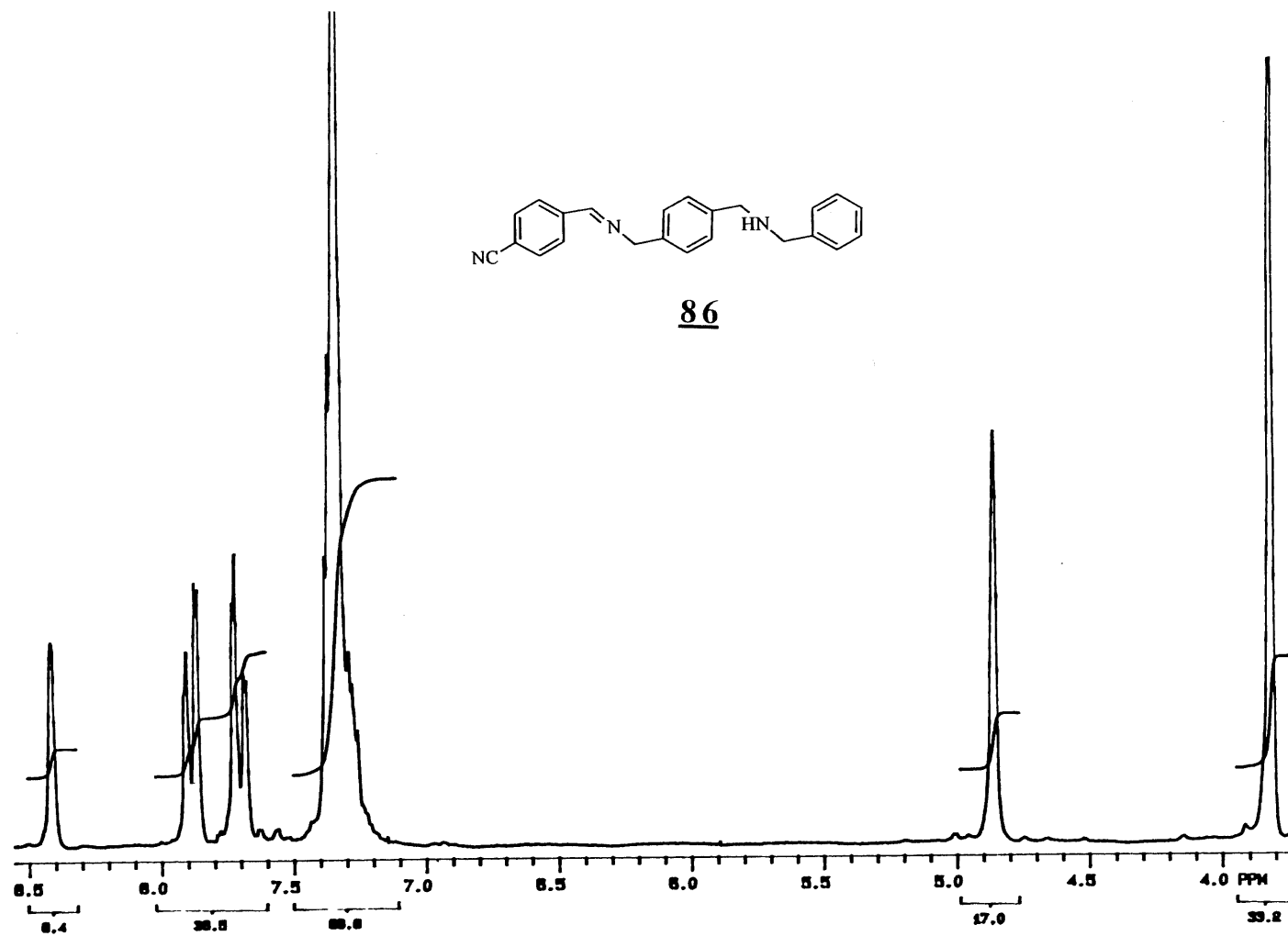


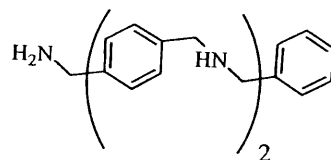
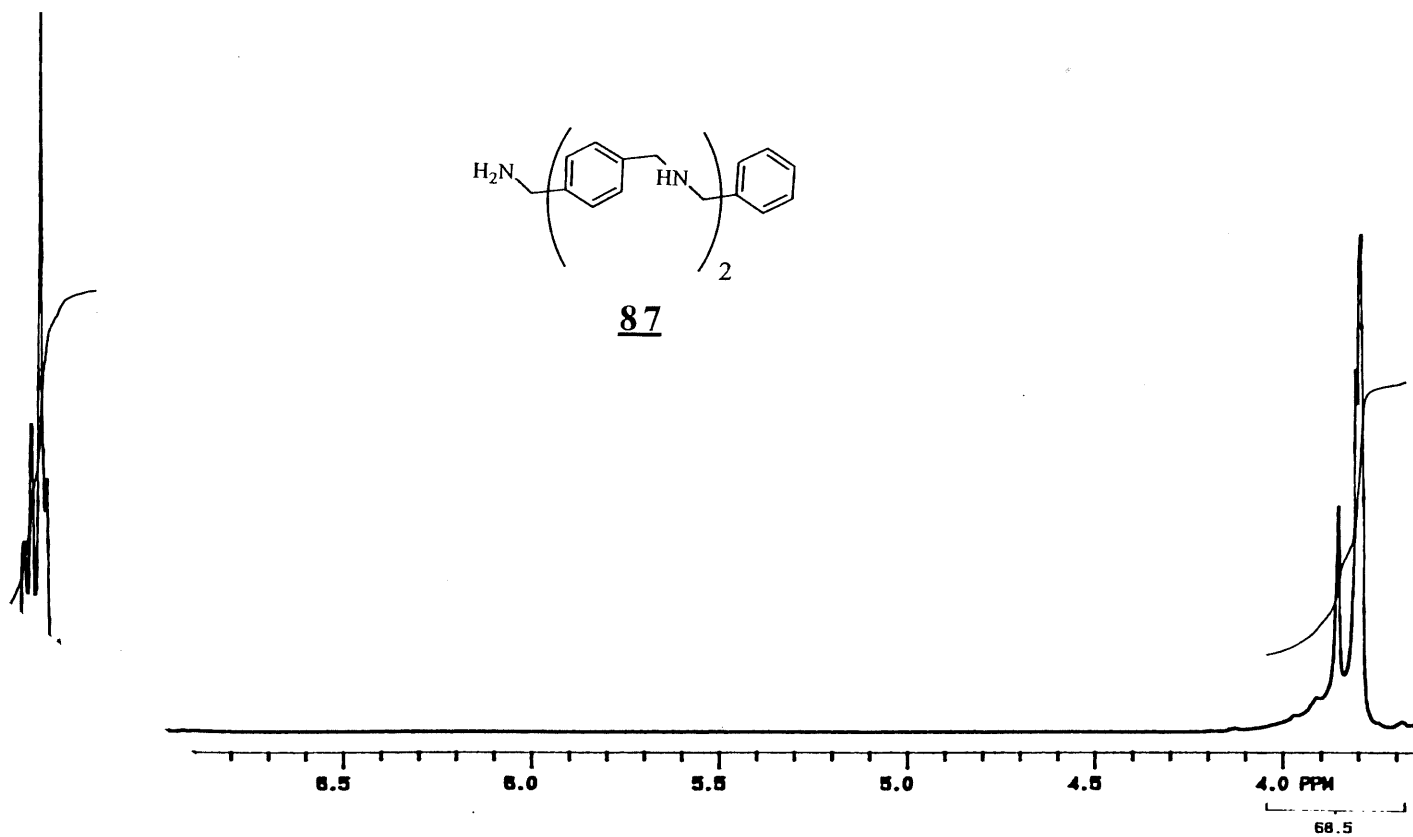
81

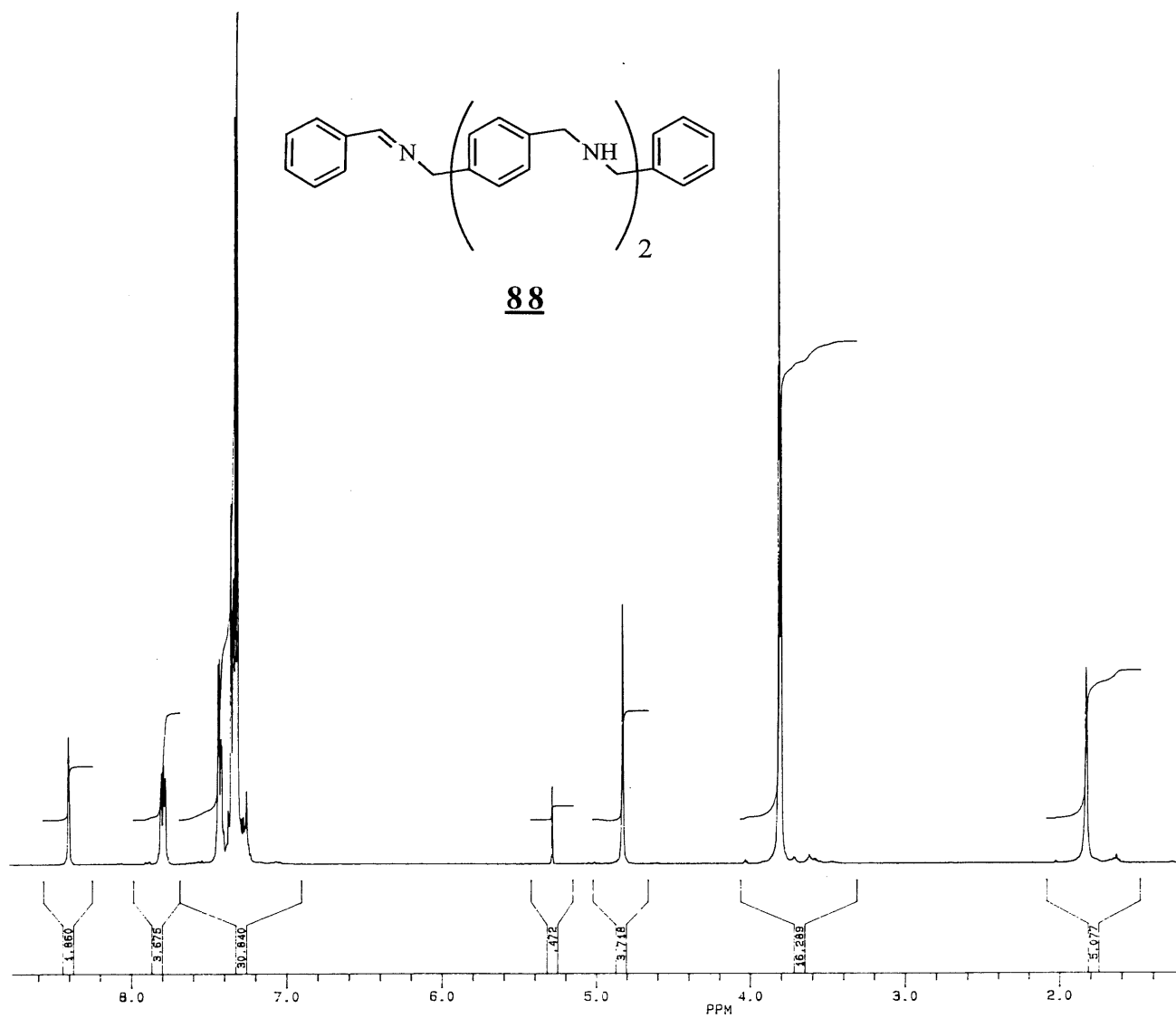


**84**

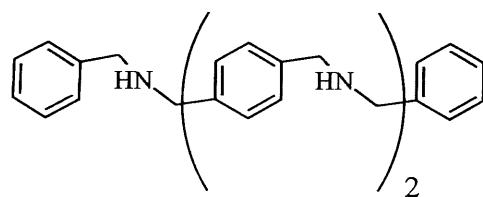
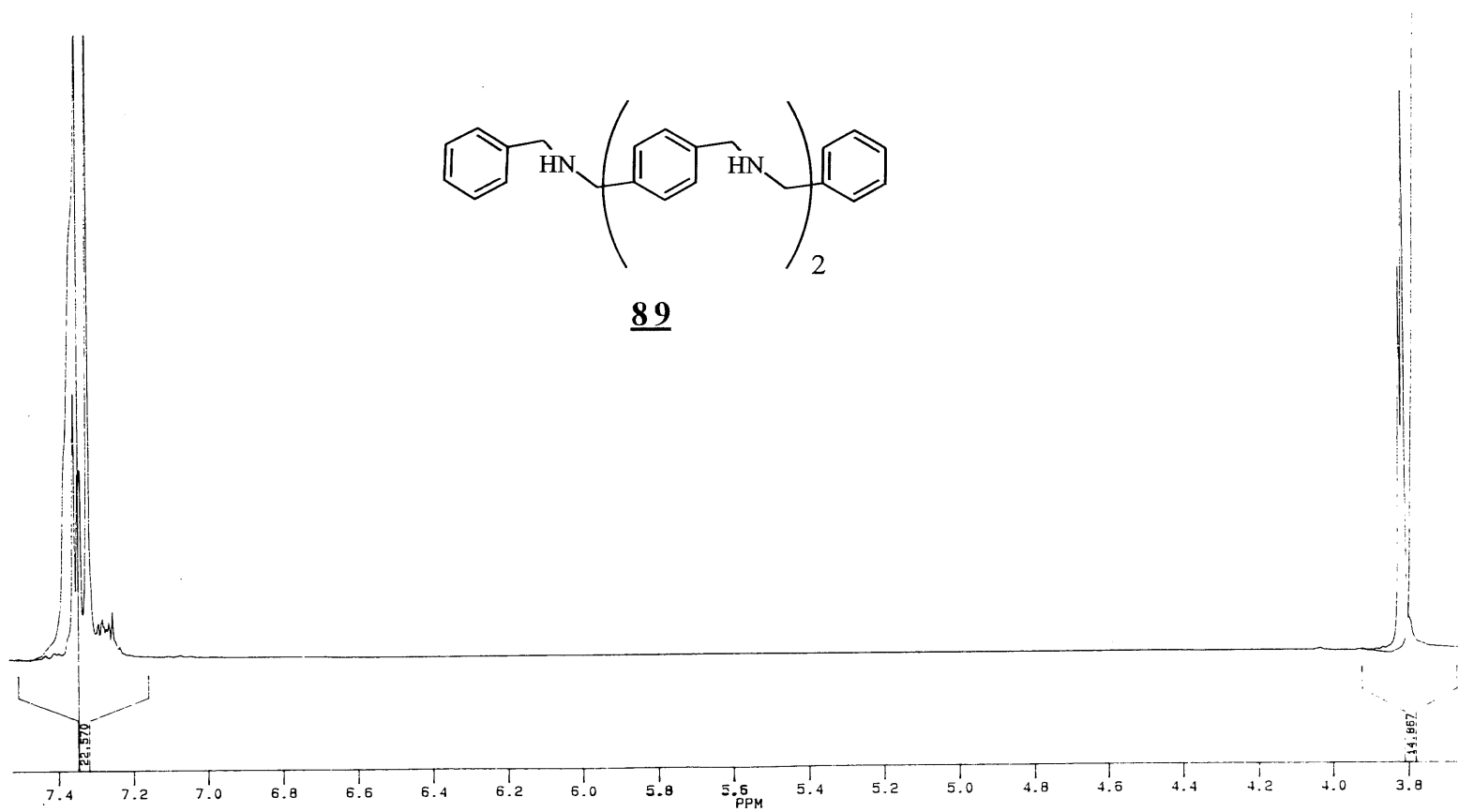


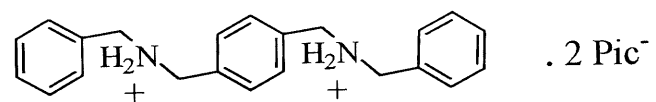


87

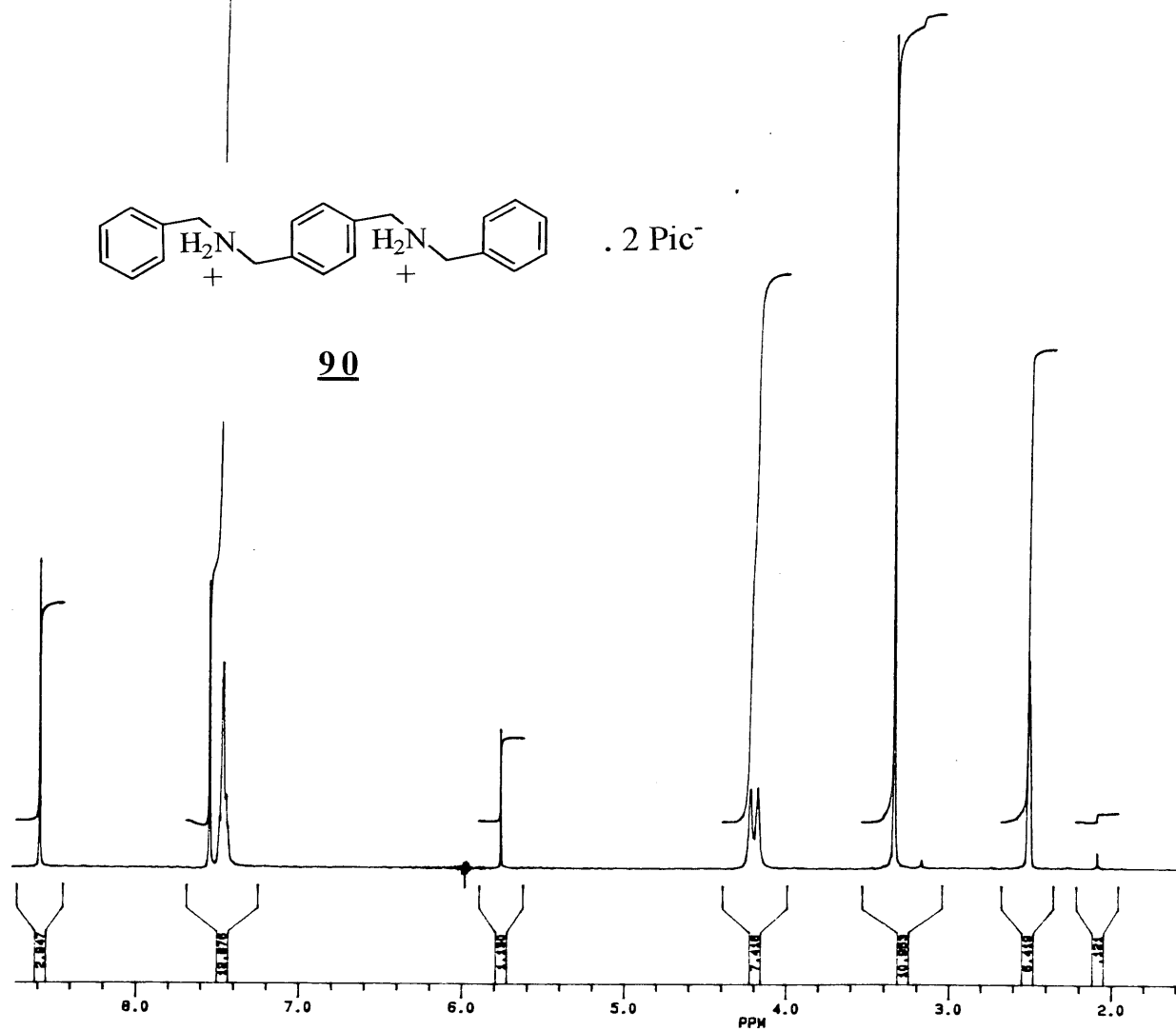


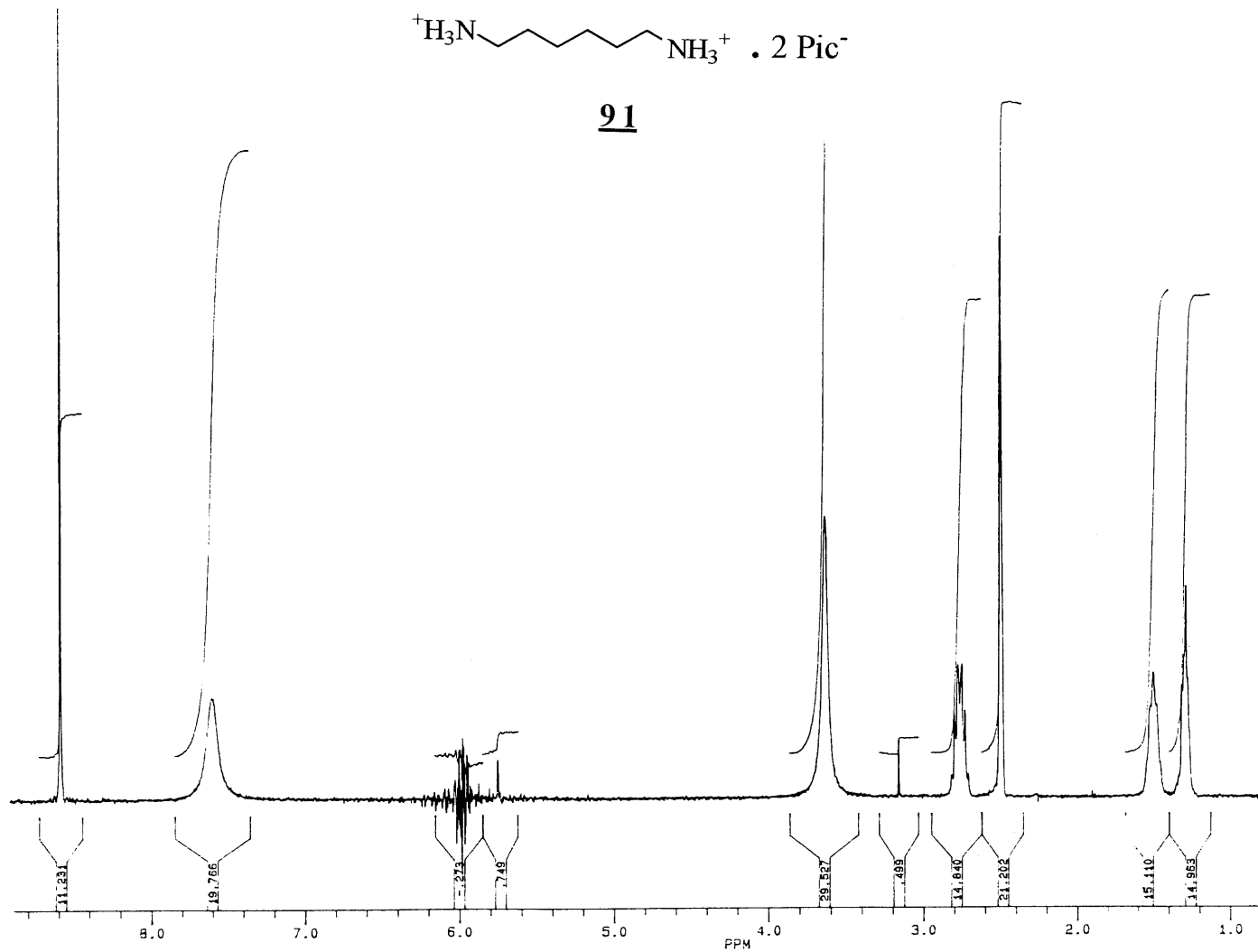


**89**



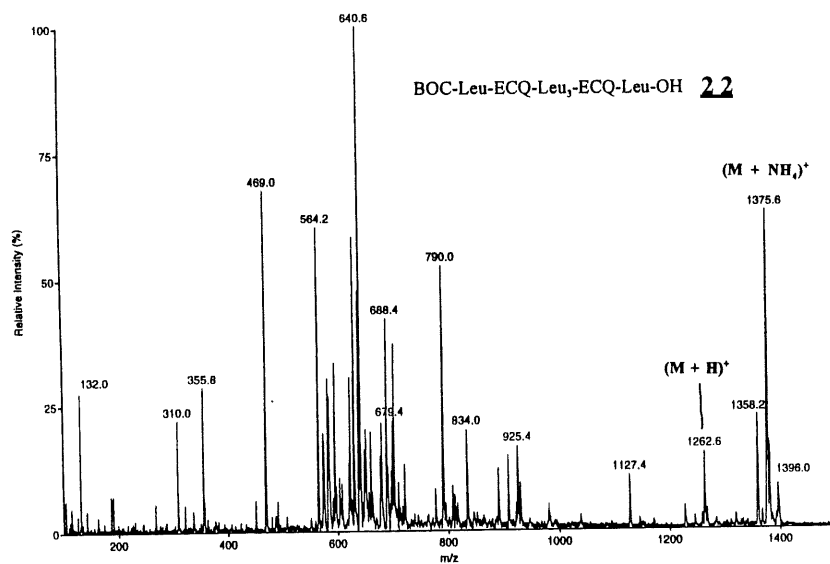
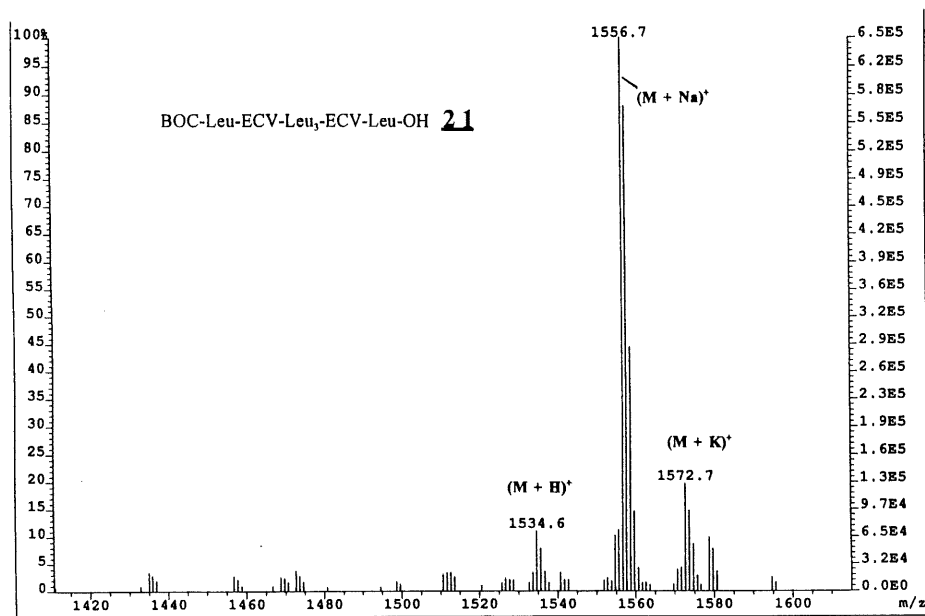
**90**

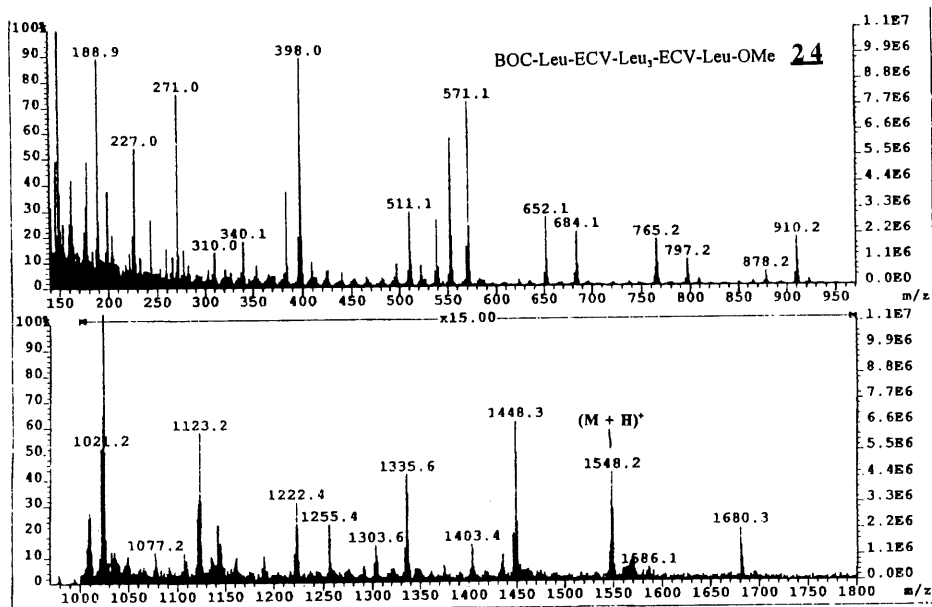
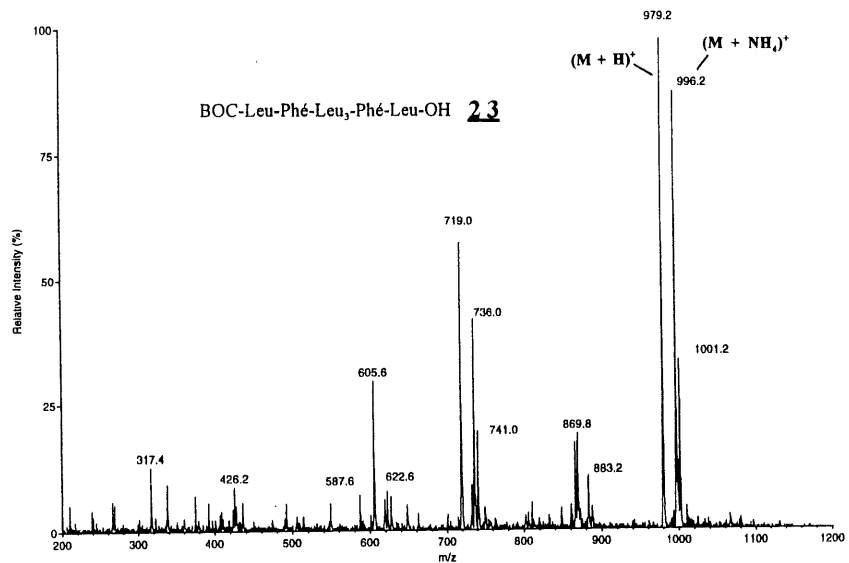


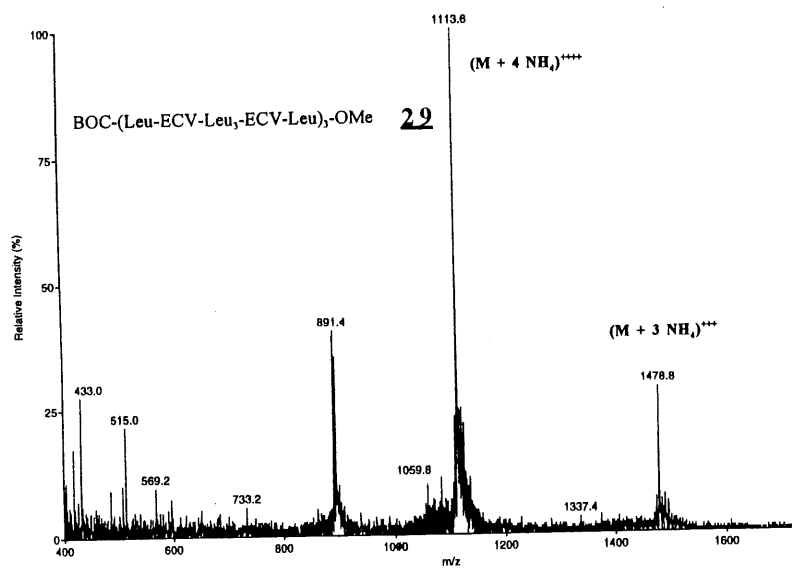
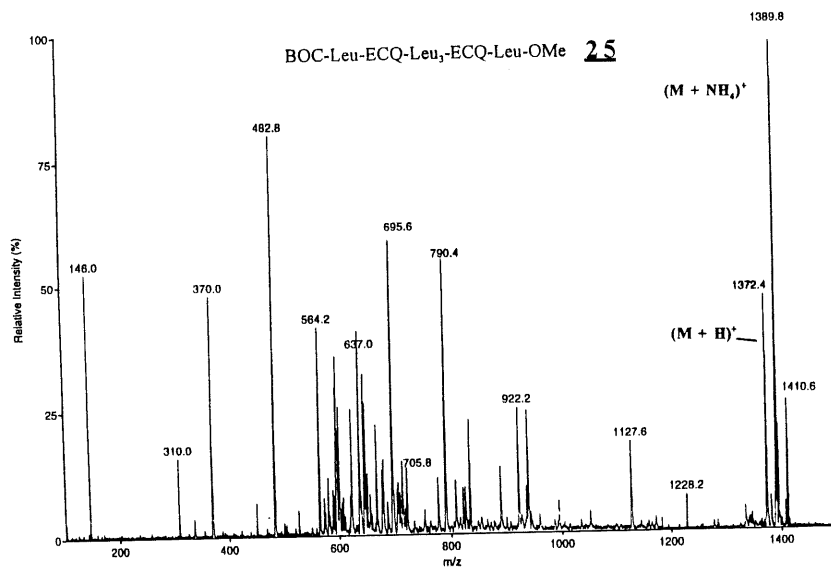


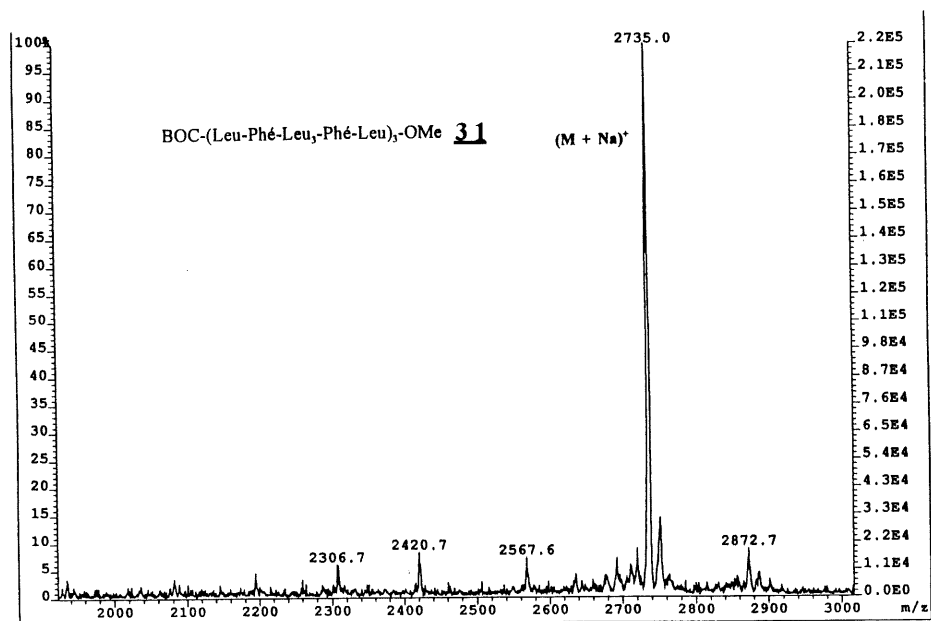
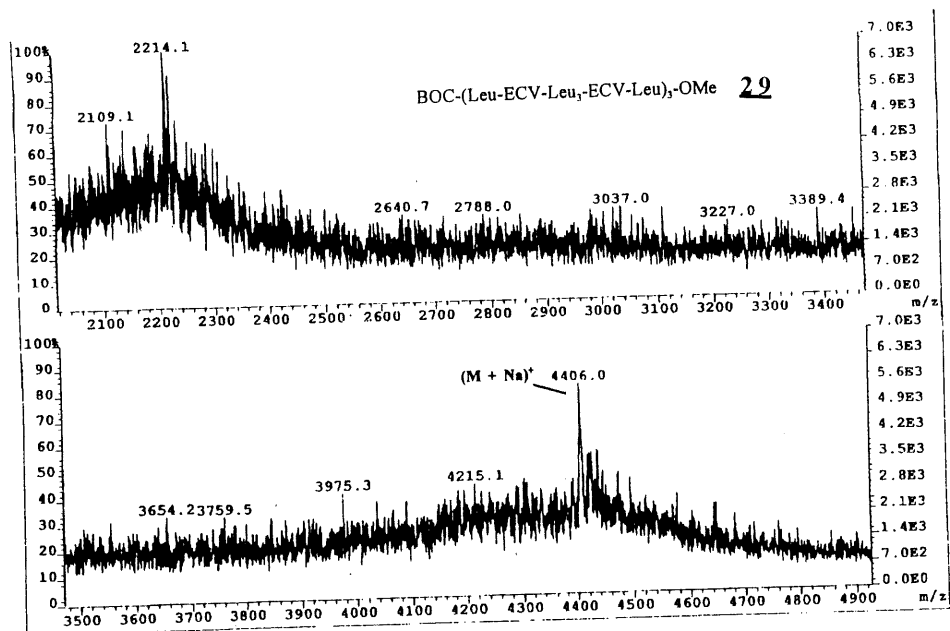
## **ANNEXE 2**

### **SPECTRES DE MASSE**

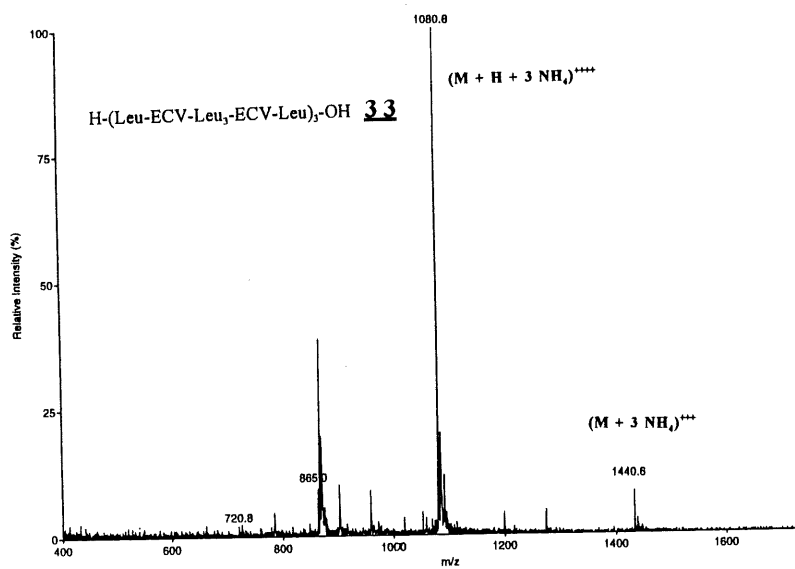
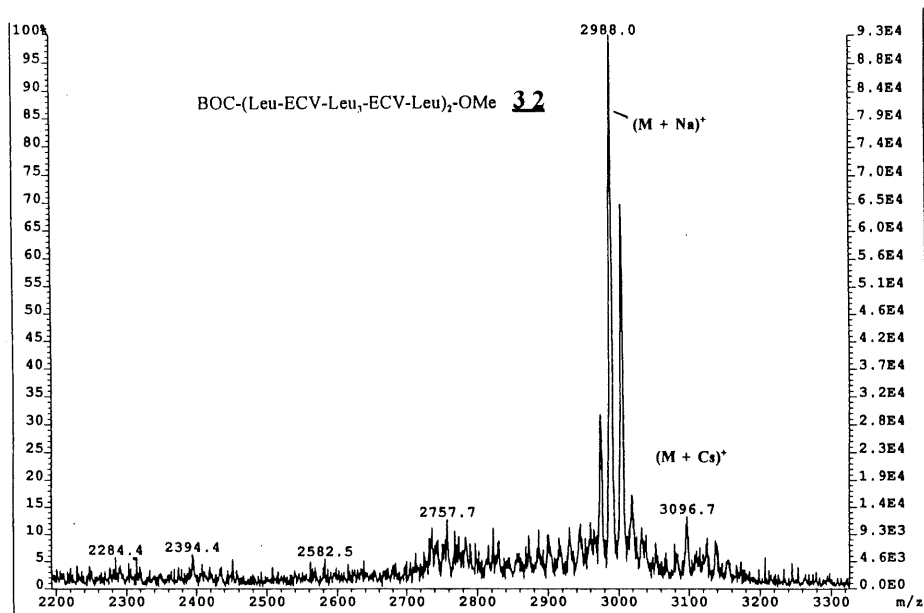


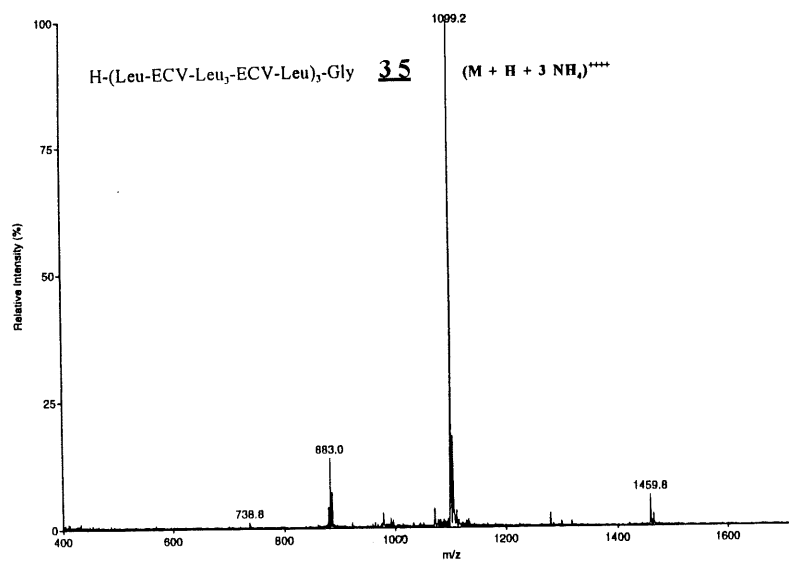
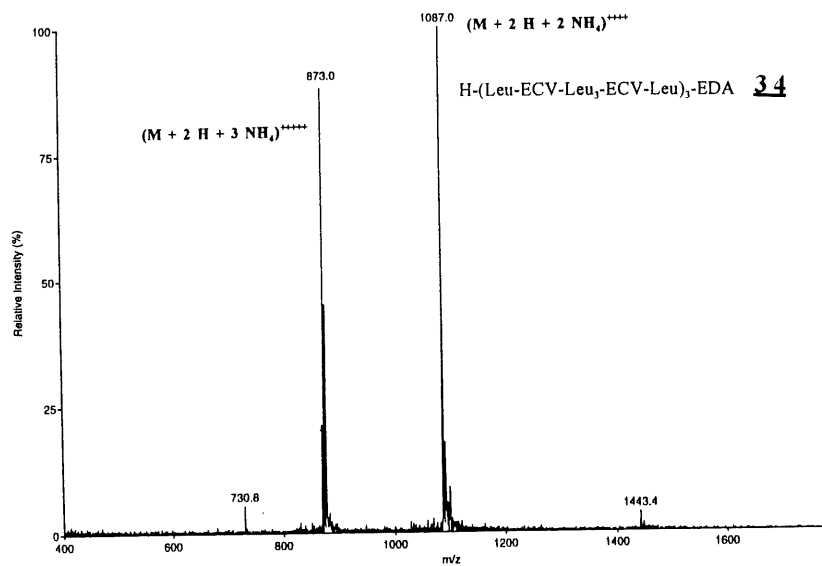


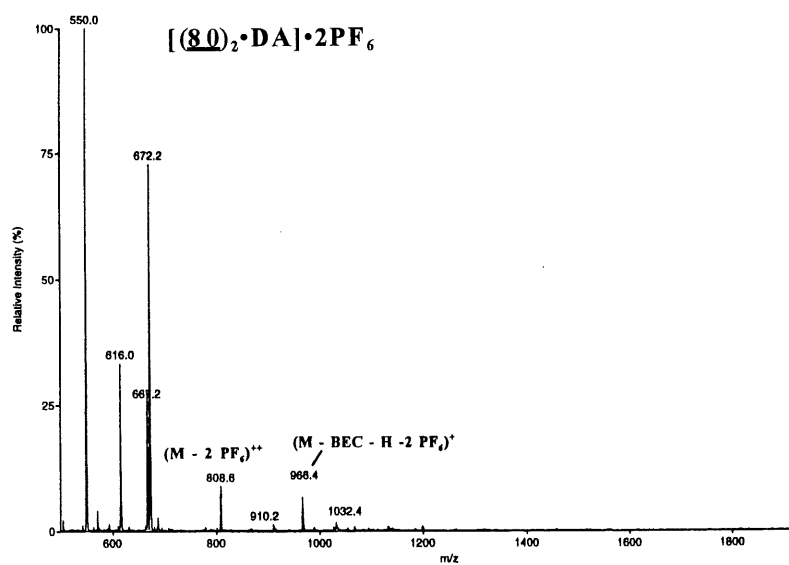
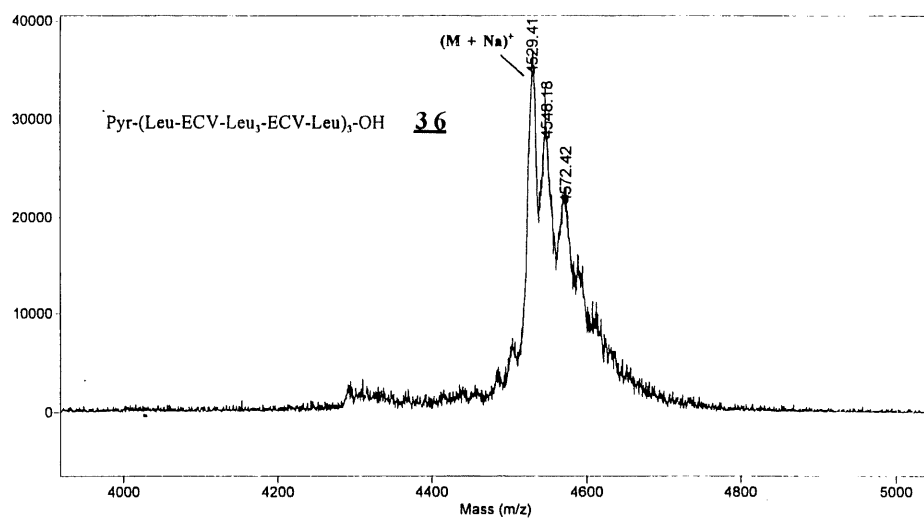


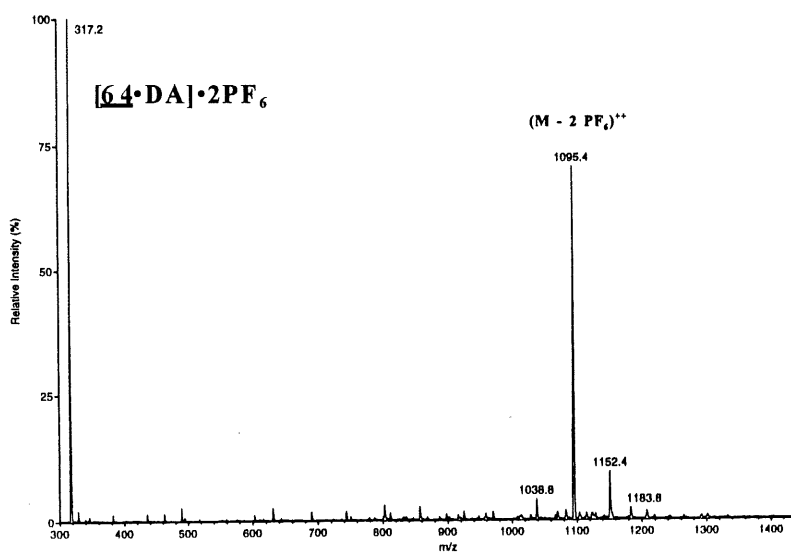
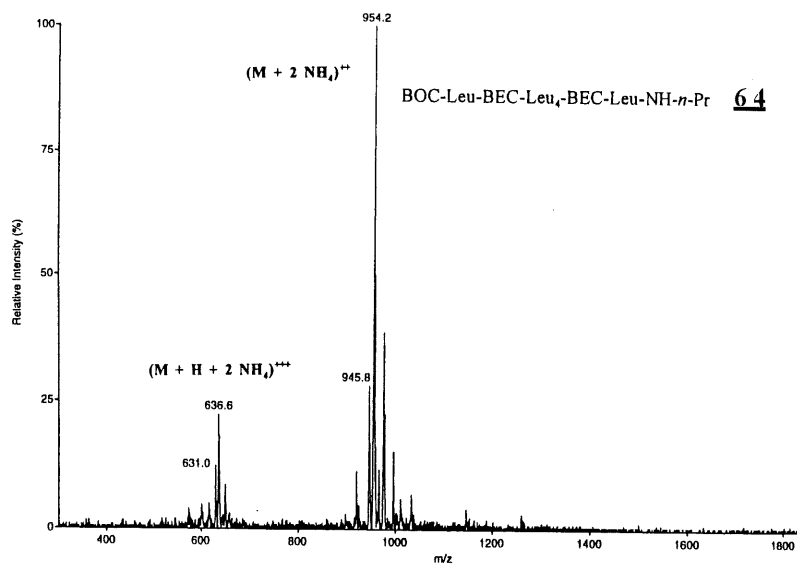


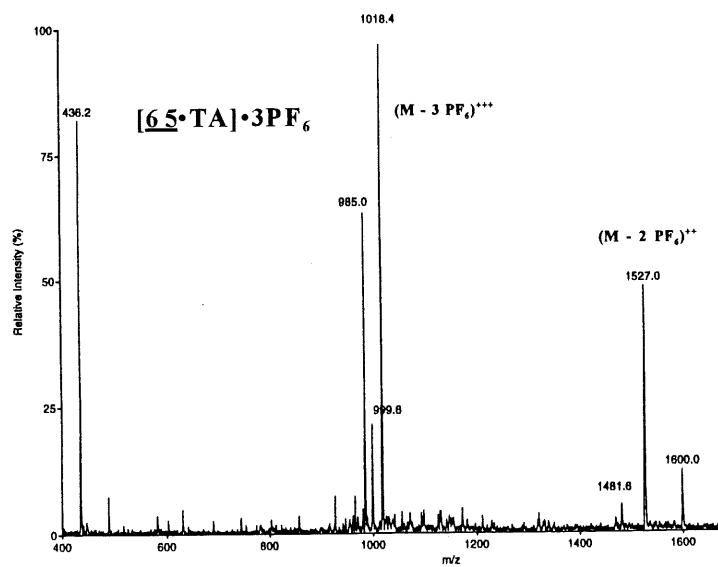
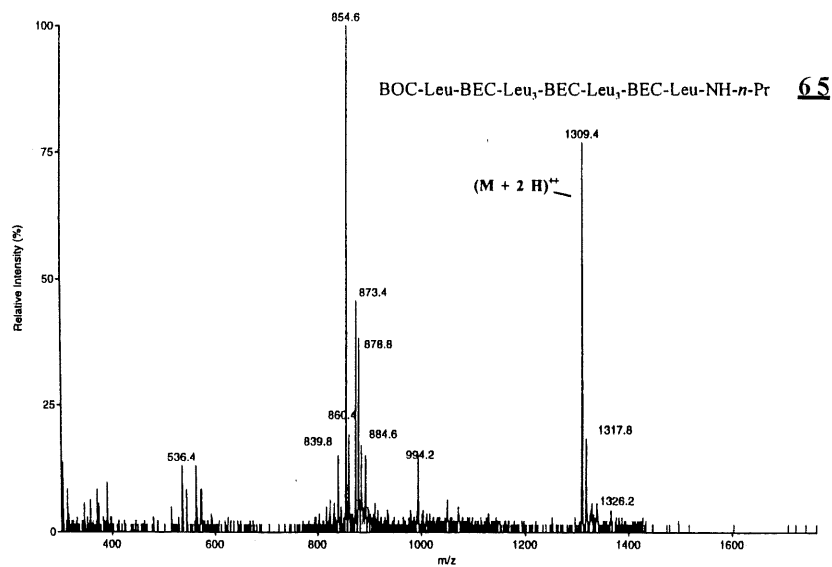




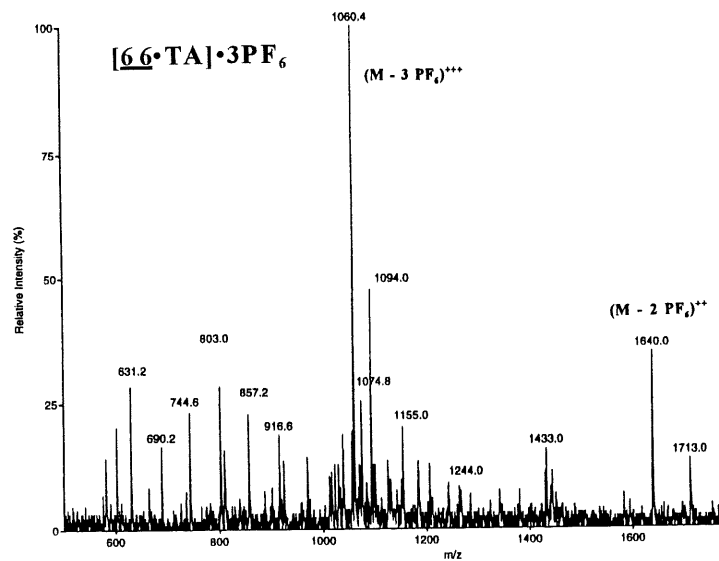
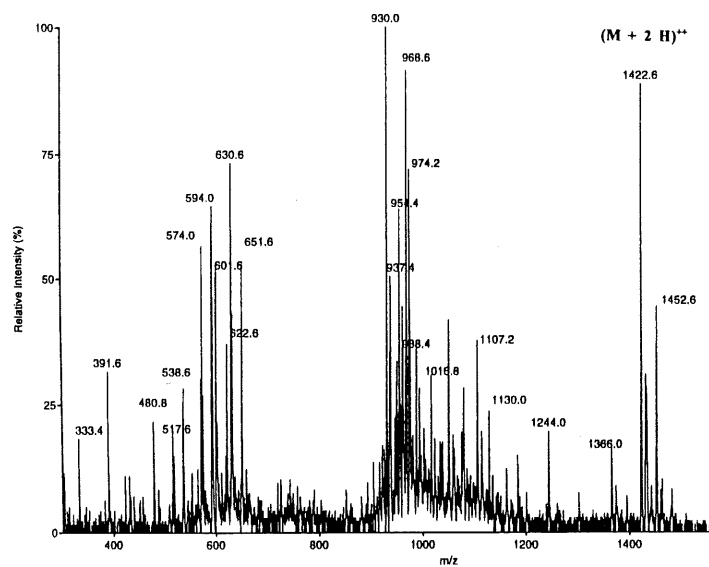


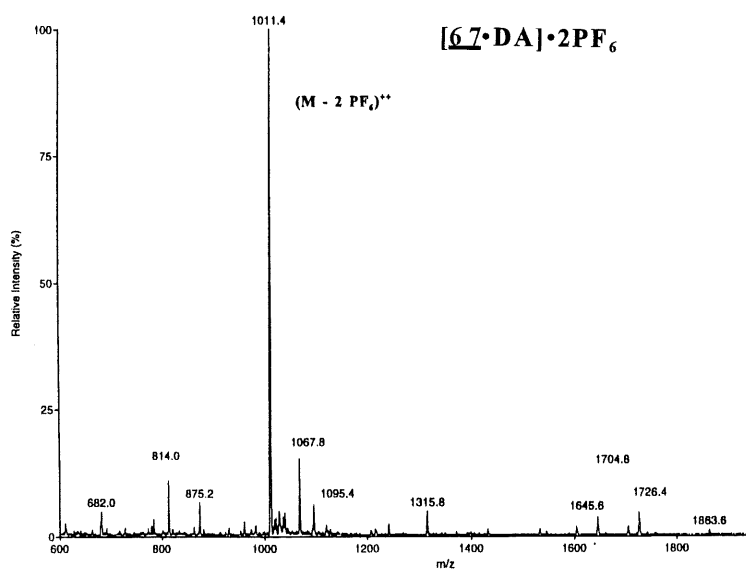
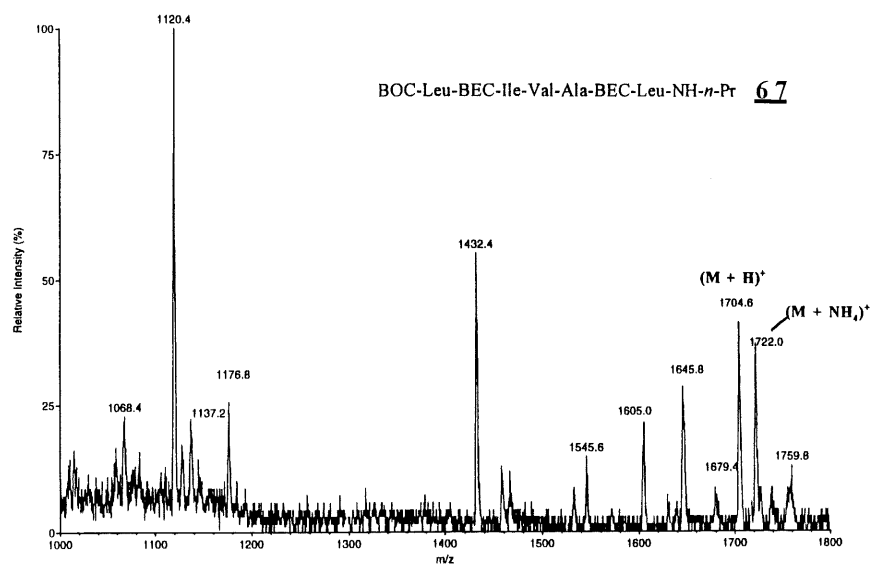


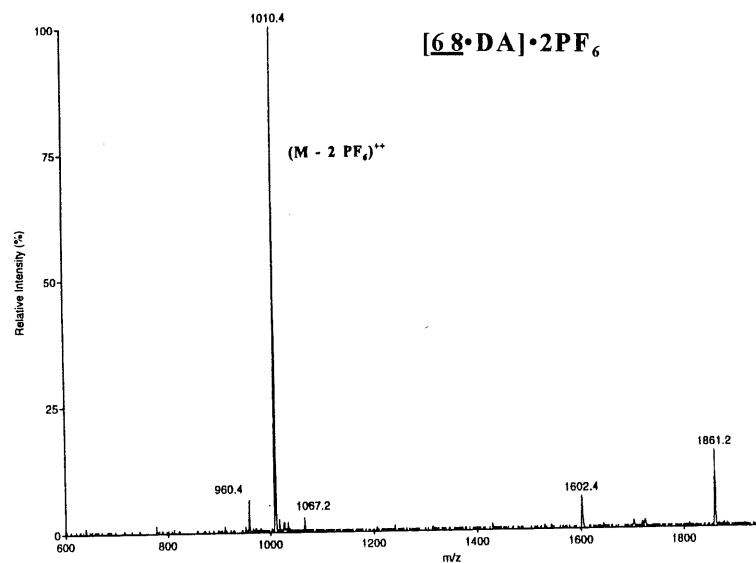
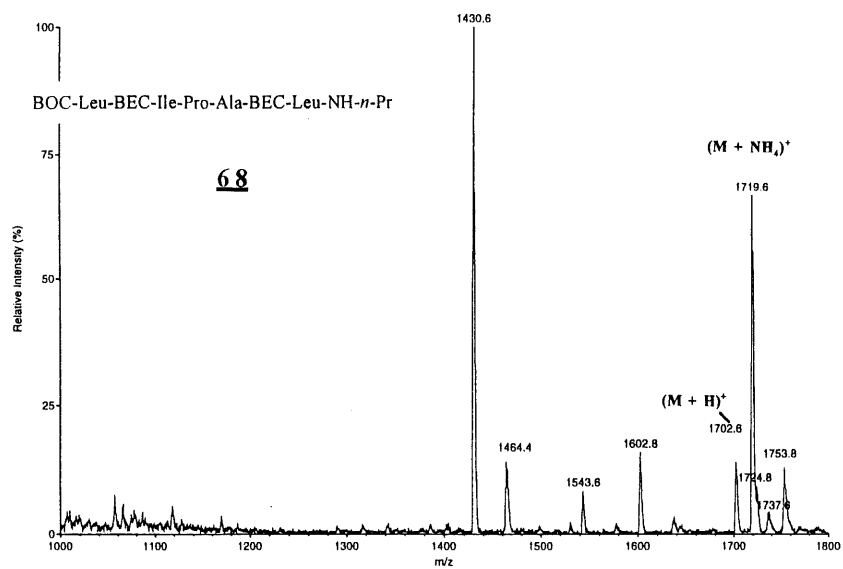




BOC-Leu-BEC-Leu-BEC-Leu-BEC-Leu-NH-*n*-Pr **66**



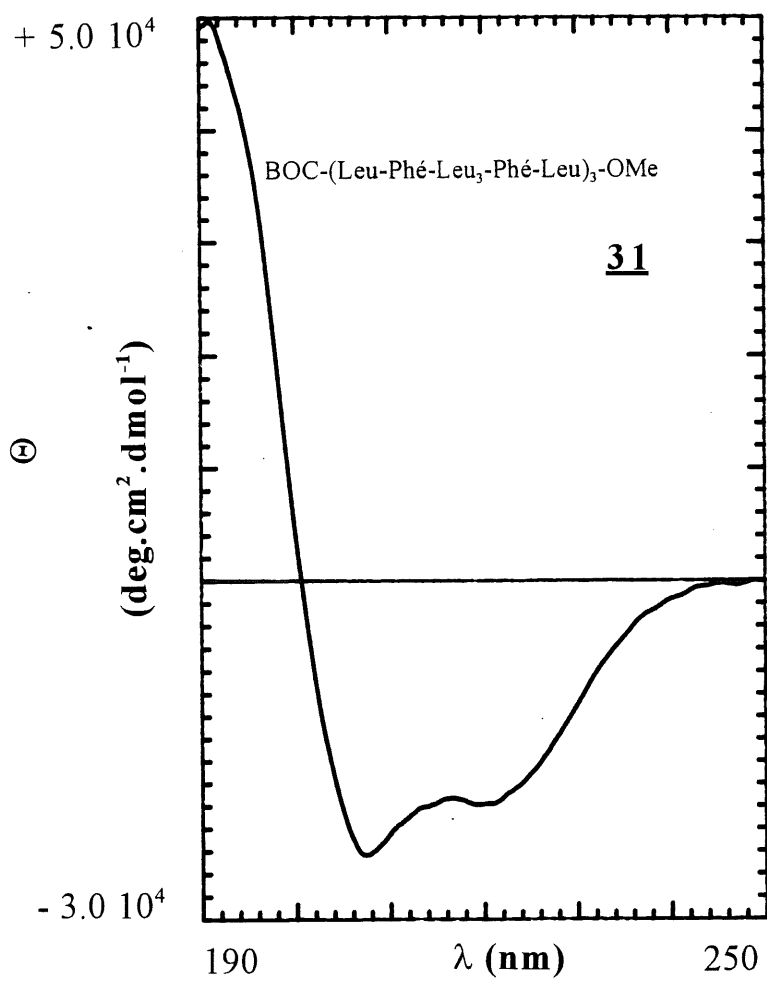


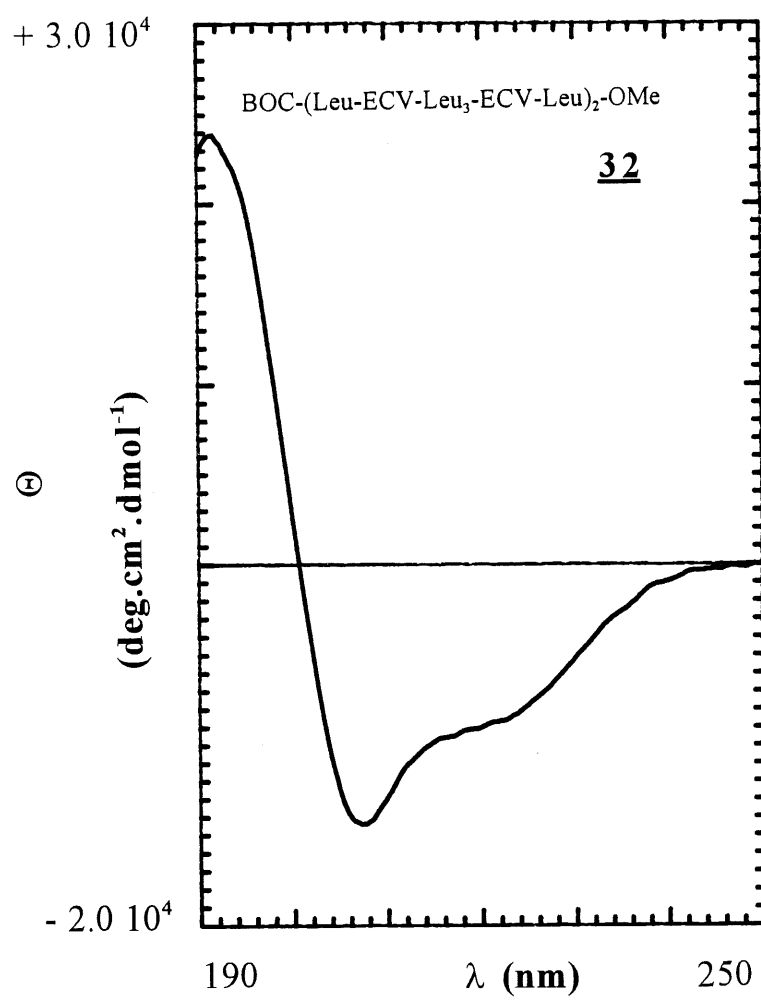


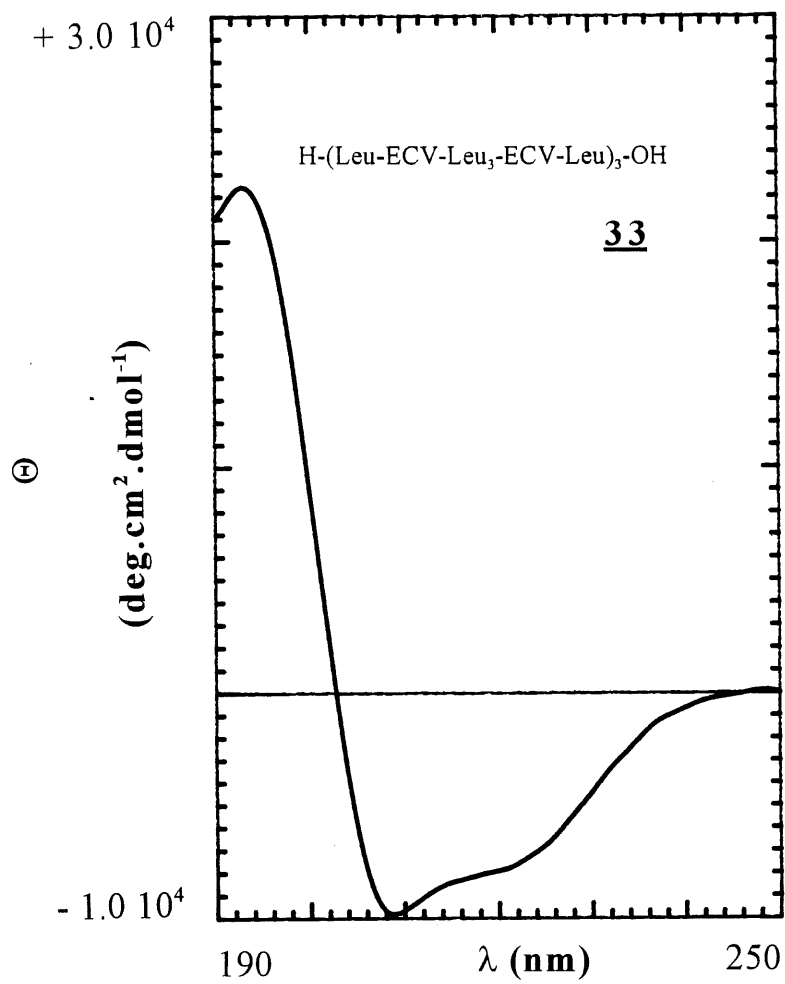


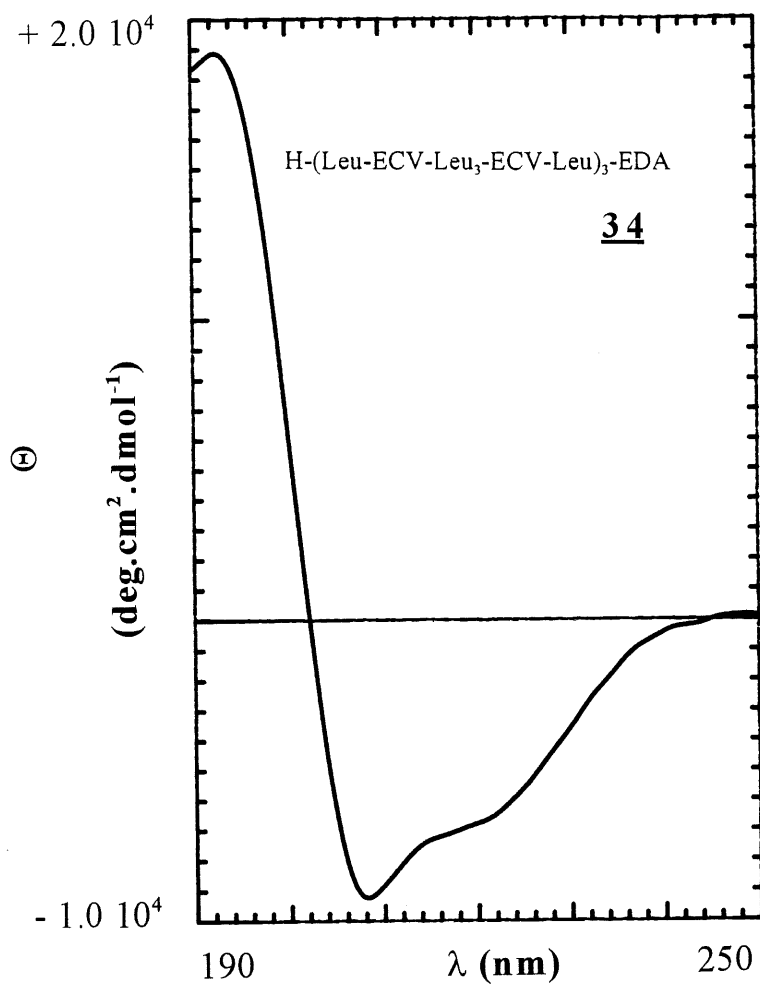
## **ANNEXE 3**

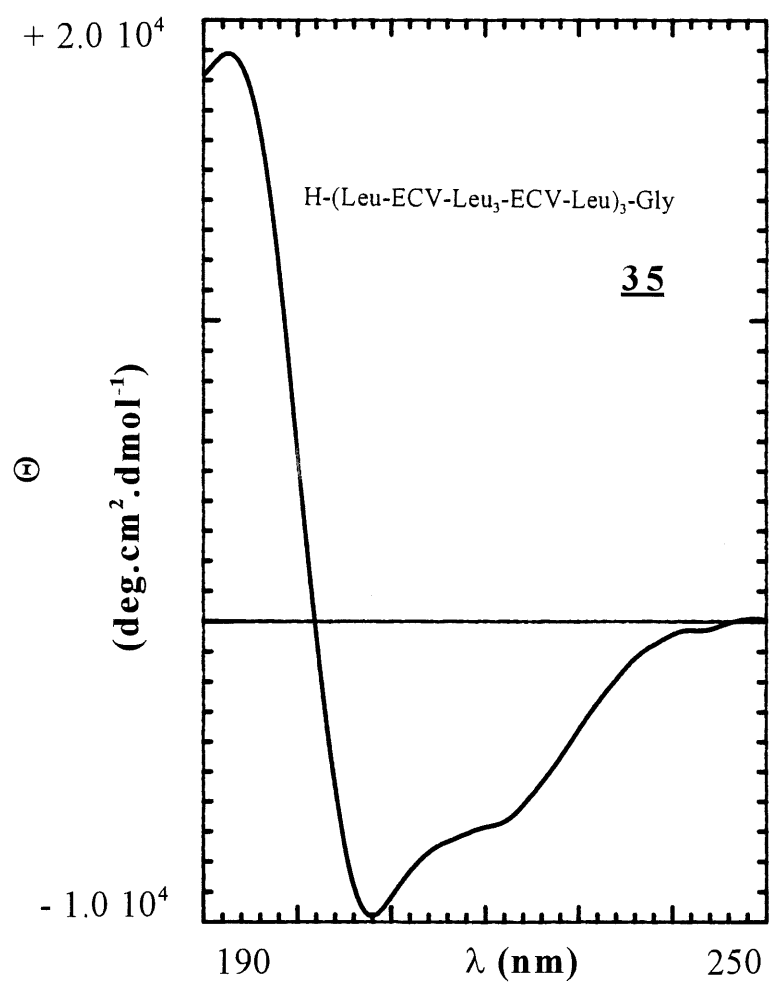
### **COURBES DE DICHROÏSME CIRCULAIRE**







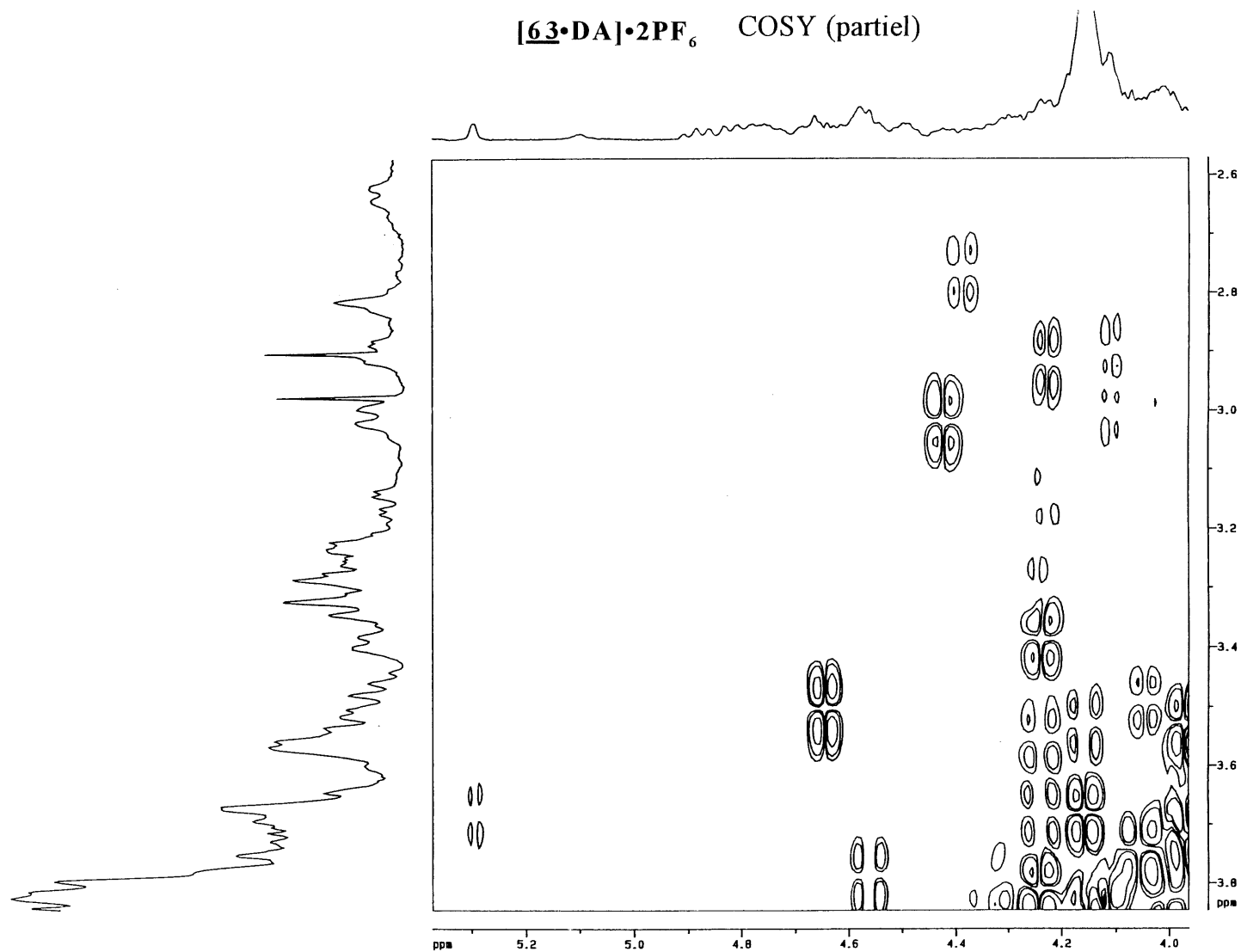




## **ANNEXE 4**

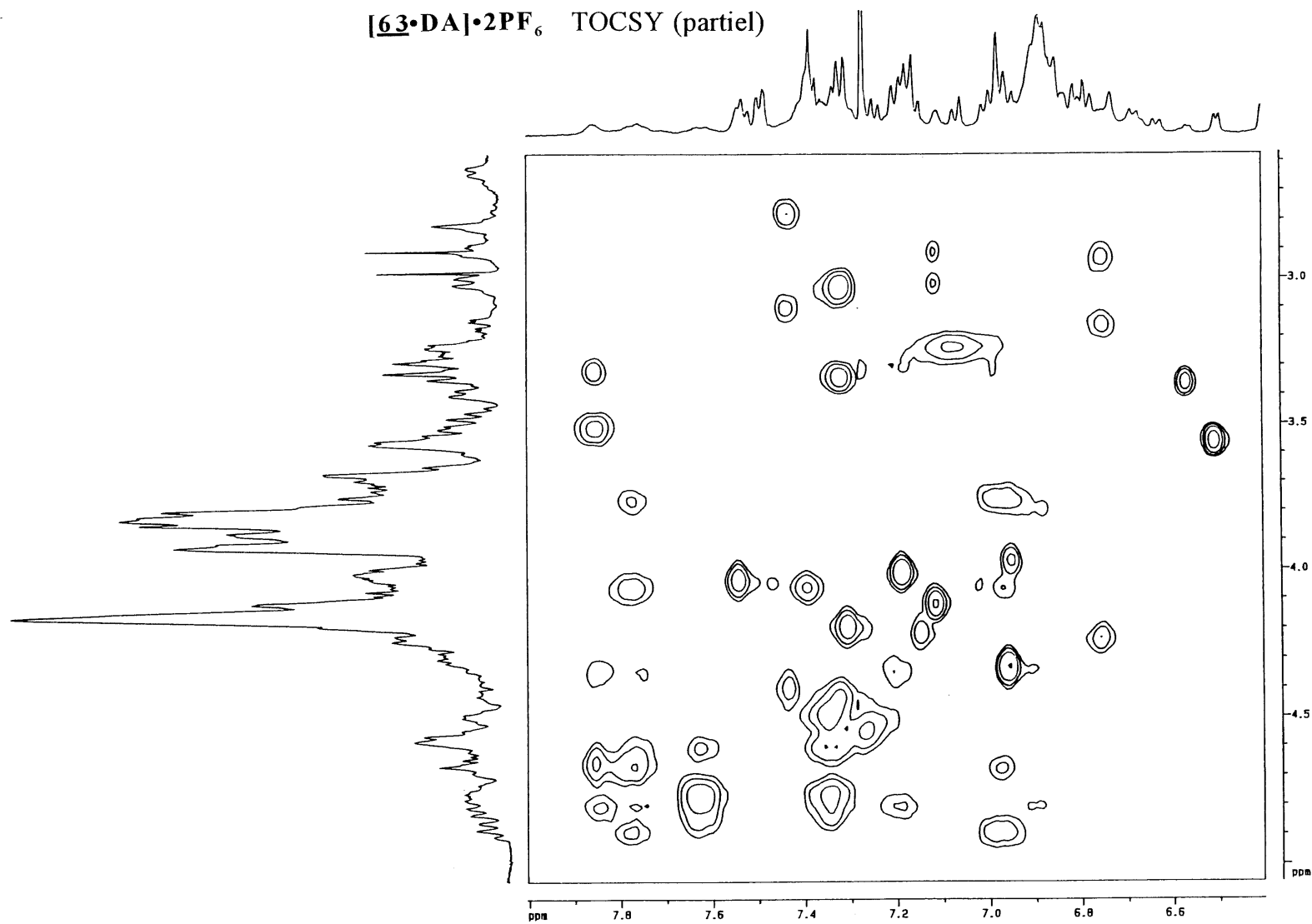
### **SPECTRES COSY ET TOCSY**

[63•DA]•2PF<sub>6</sub> COSY (partiel)

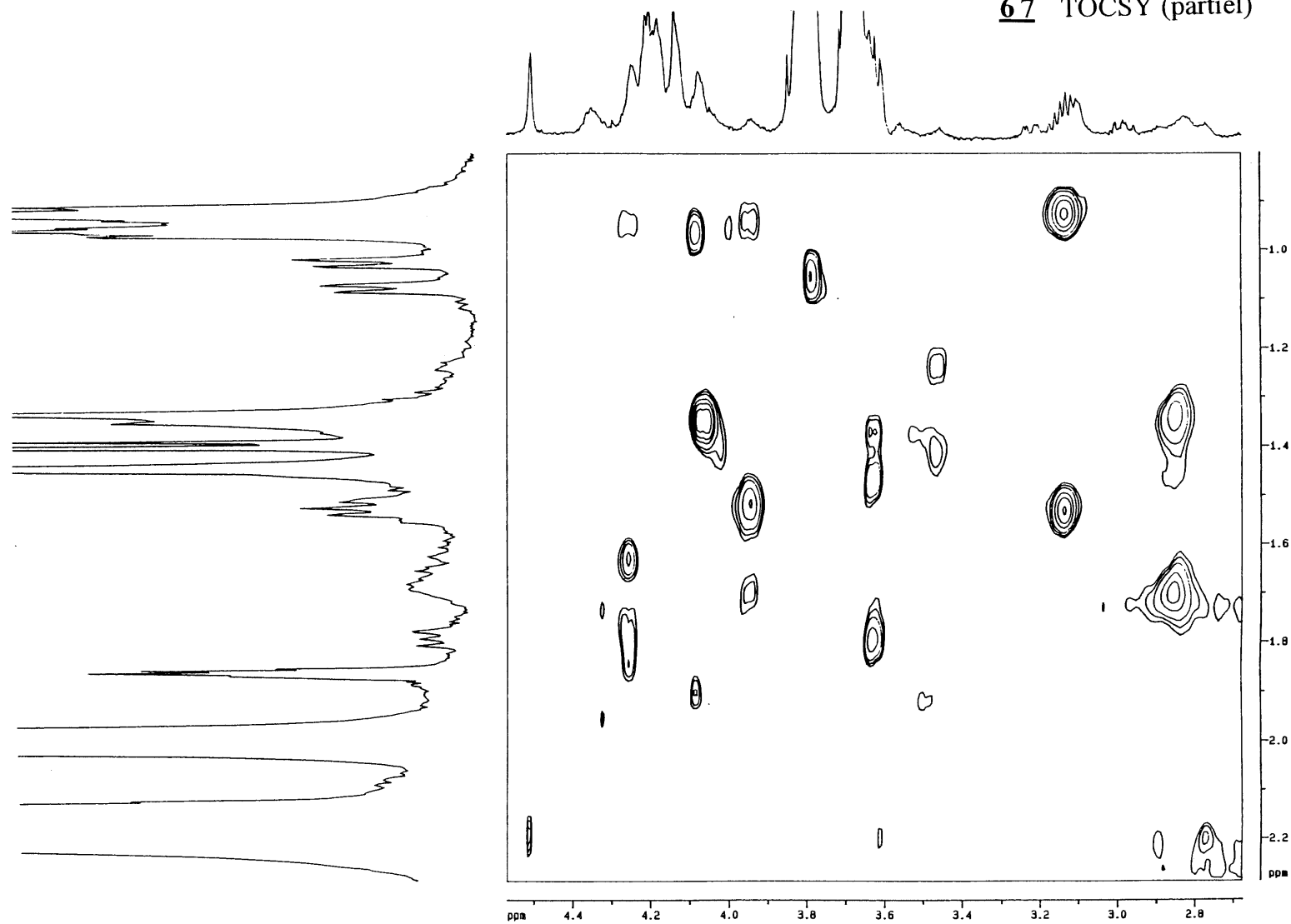




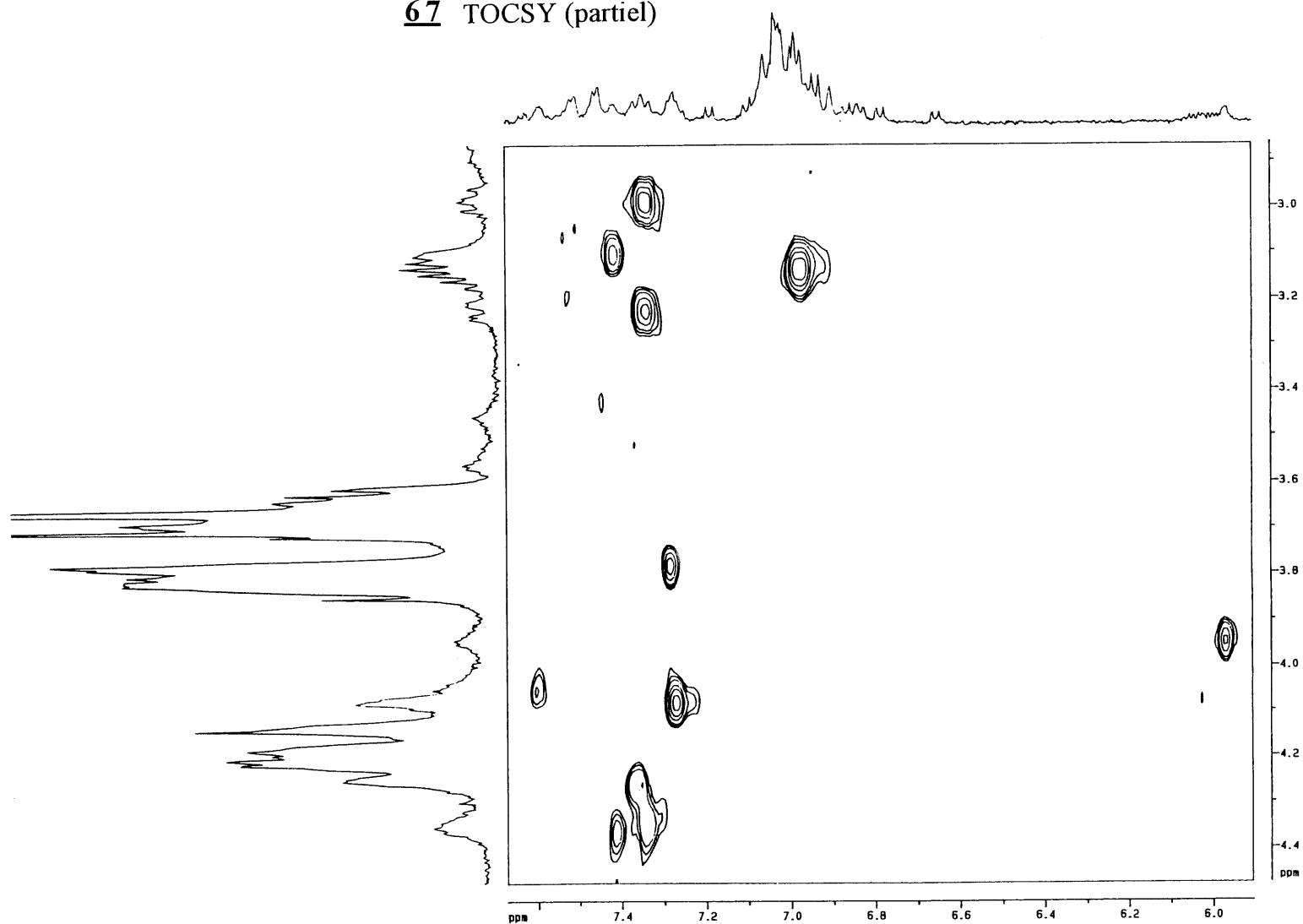
[63•DA]•2PF<sub>6</sub> TOCSY (partiel)



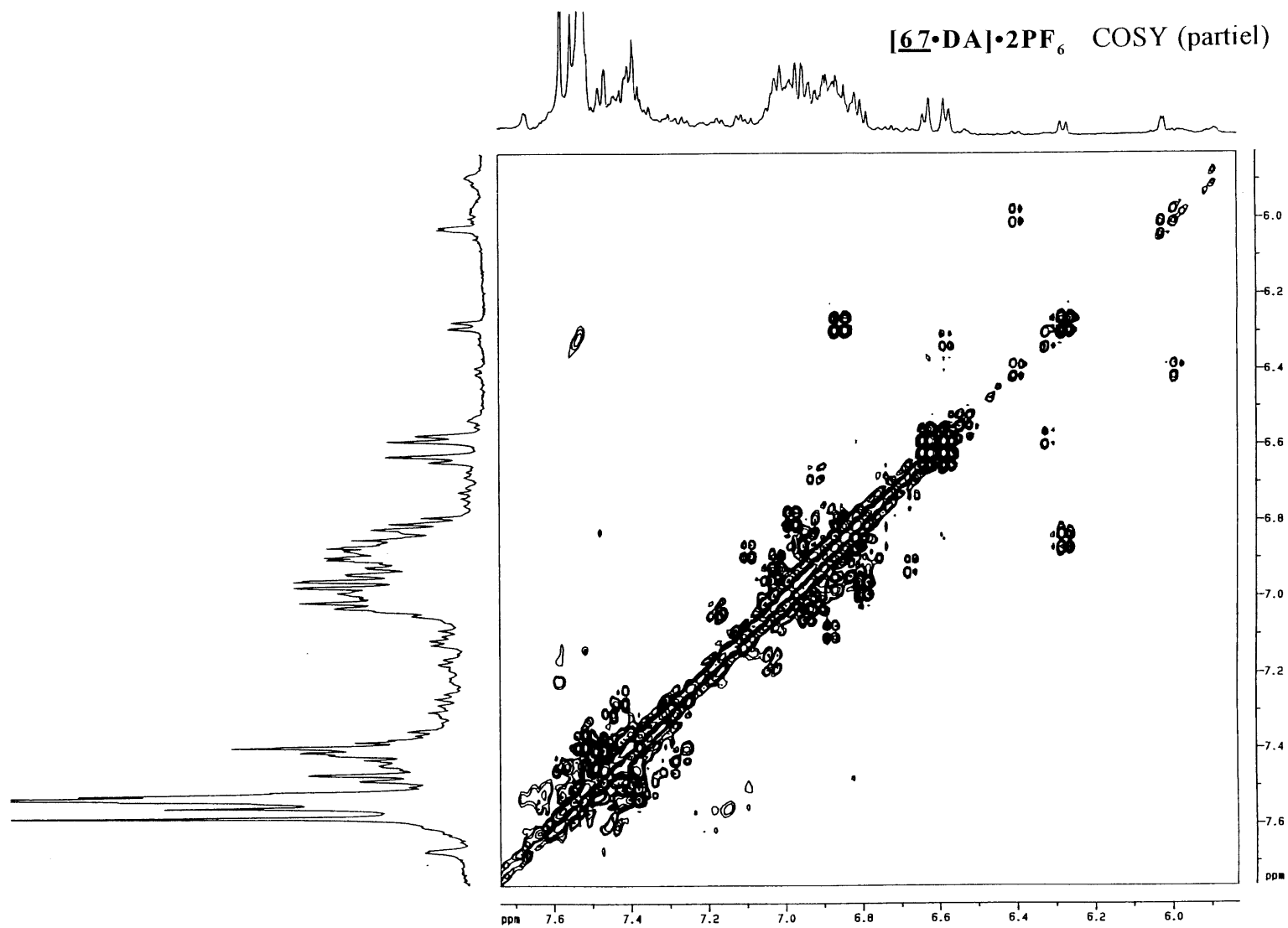
67 TOCSY (partiel)



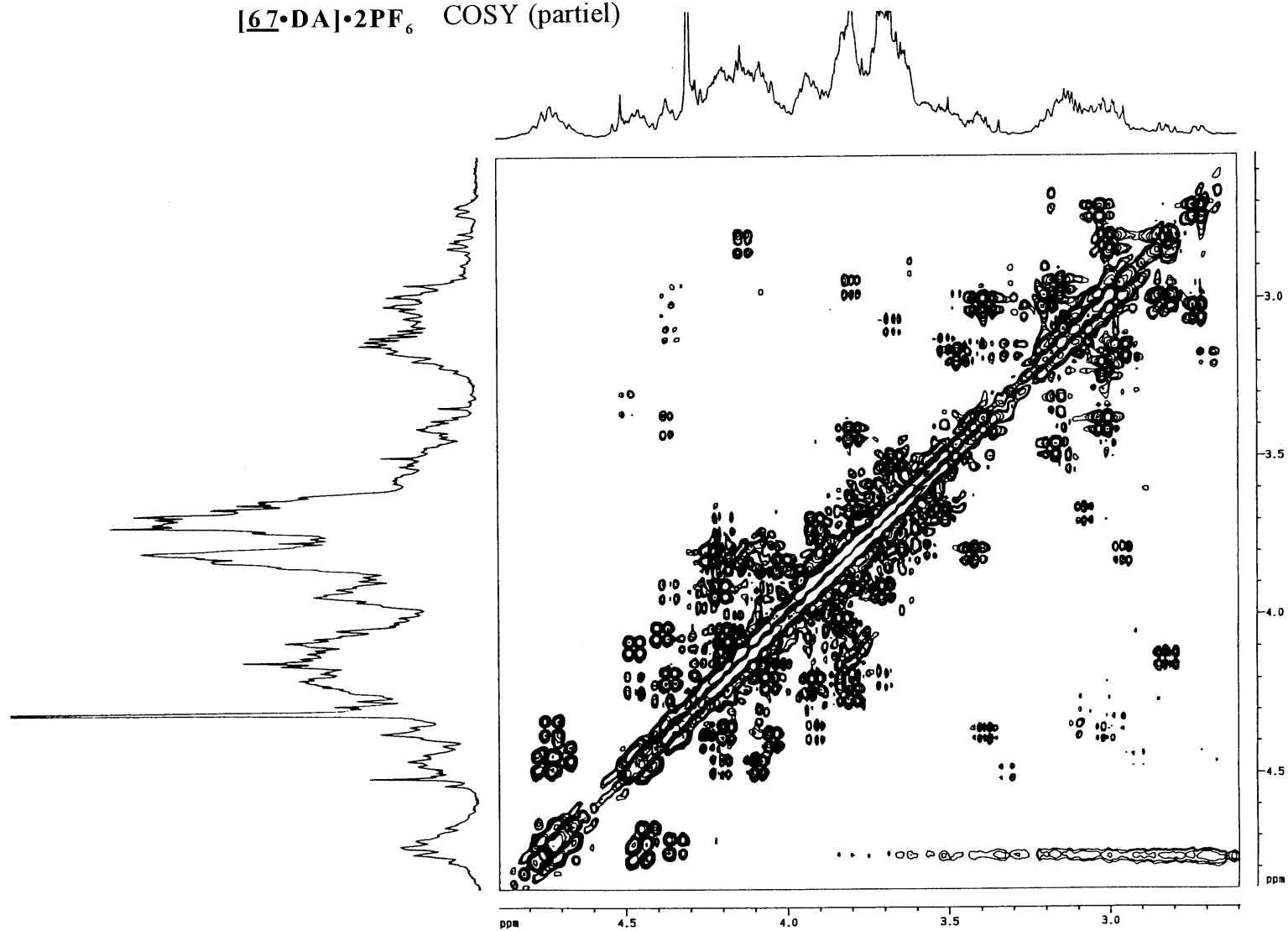
**67** TOCSY (partiel)



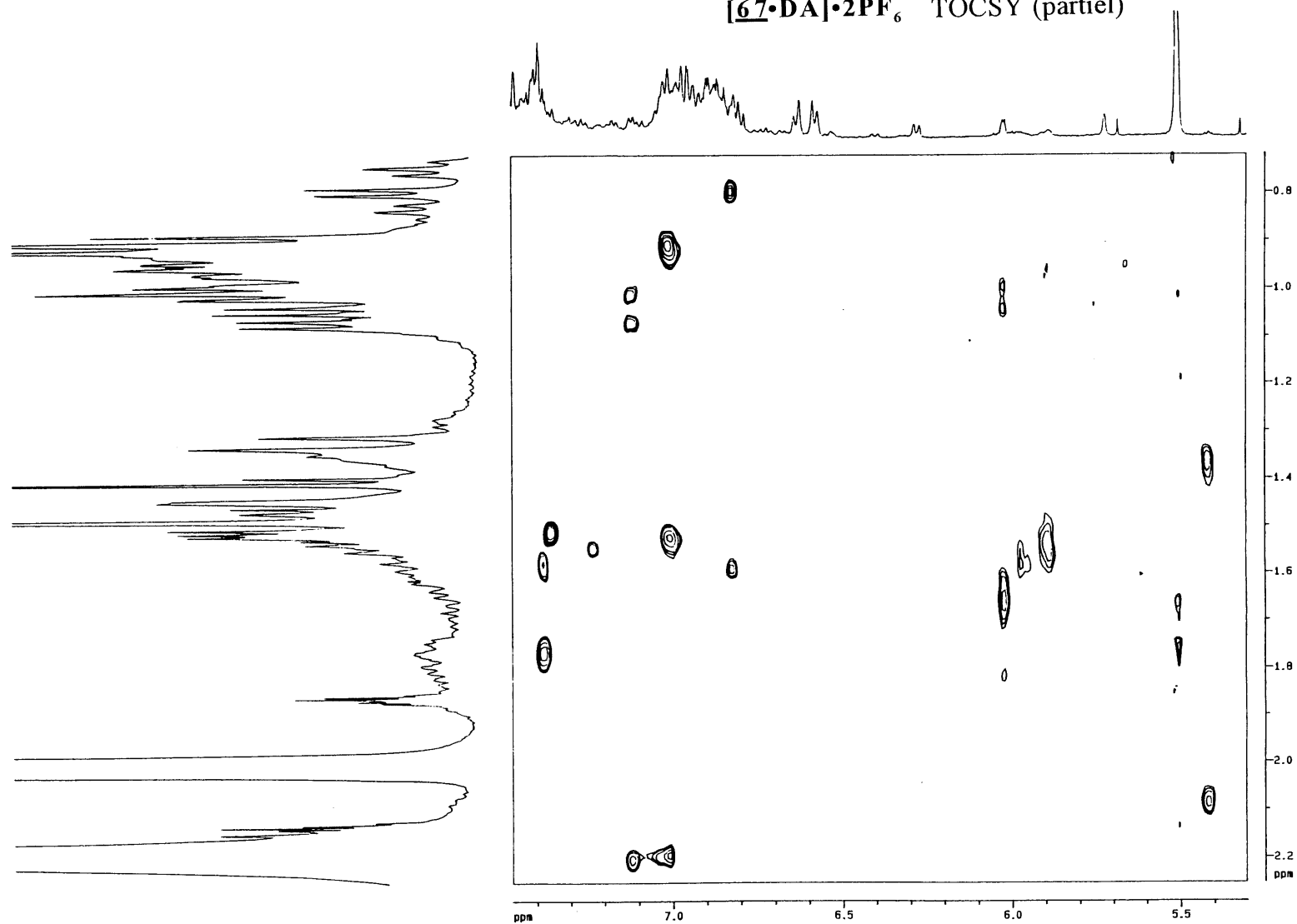
[67-DA]•2PF<sub>6</sub> COSY (partiel)

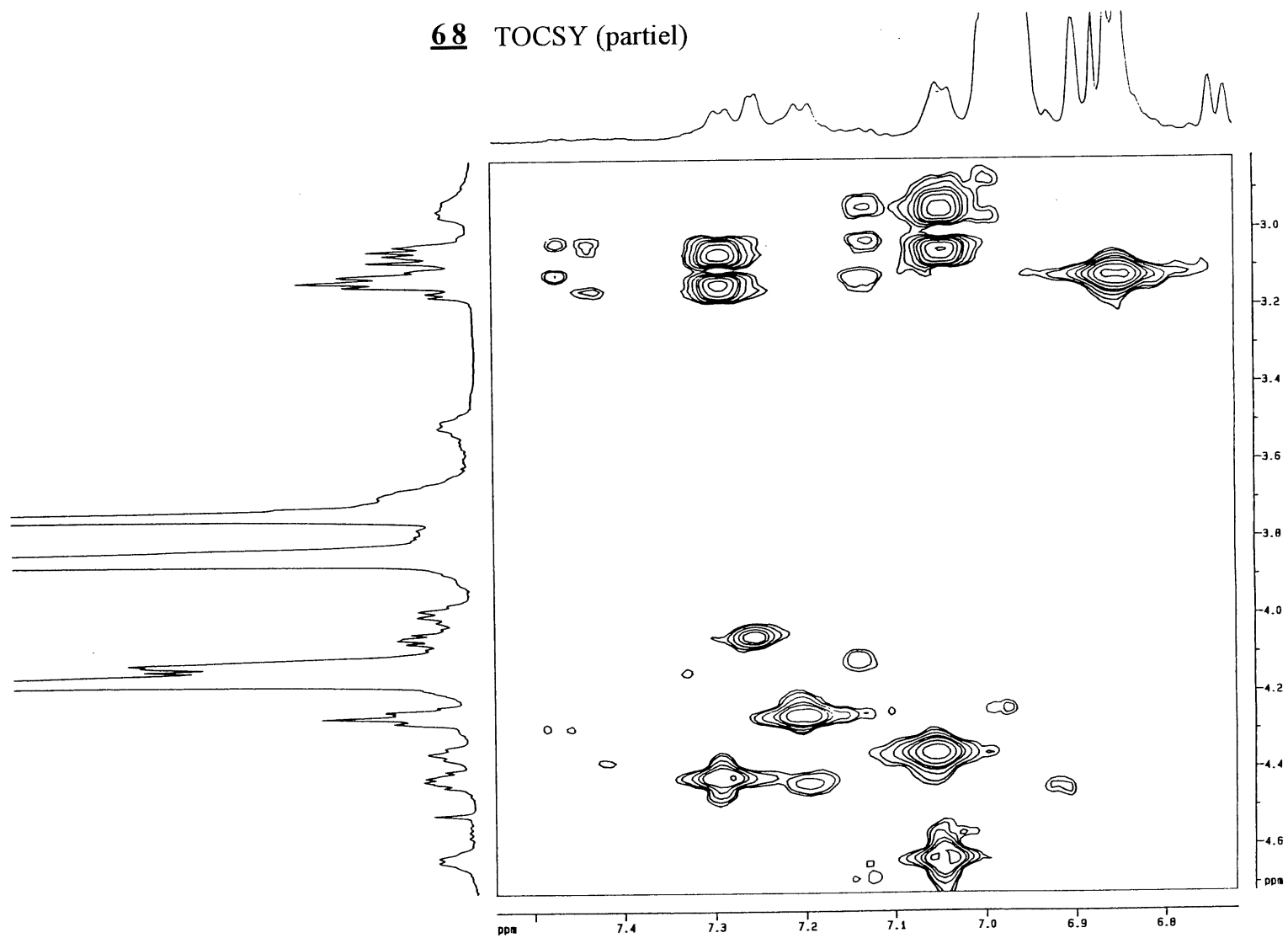


[67•DA]•2PF<sub>6</sub> COSY (partiel)

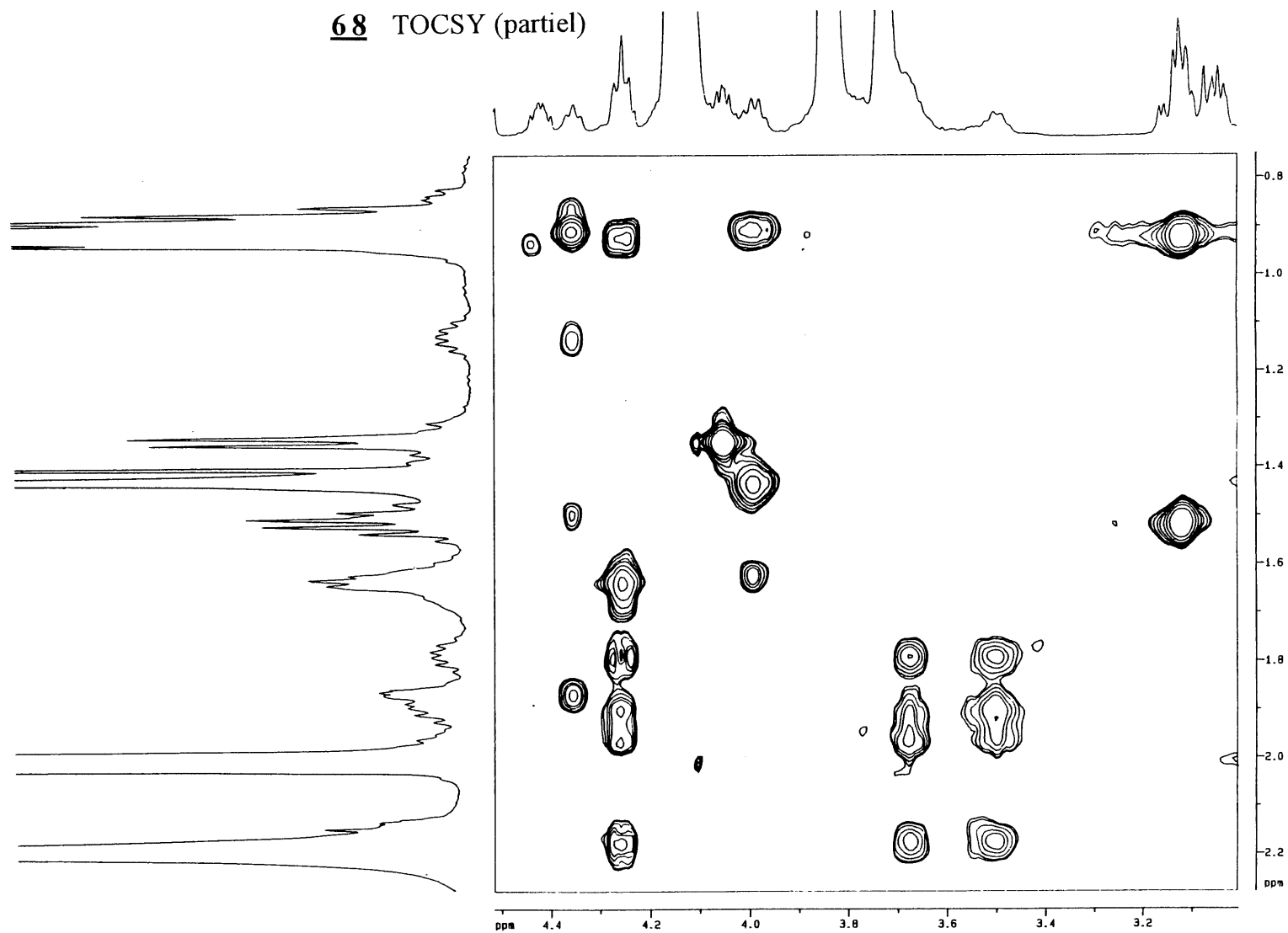


[67•DA]•2PF<sub>6</sub> TOCSY (partiel)

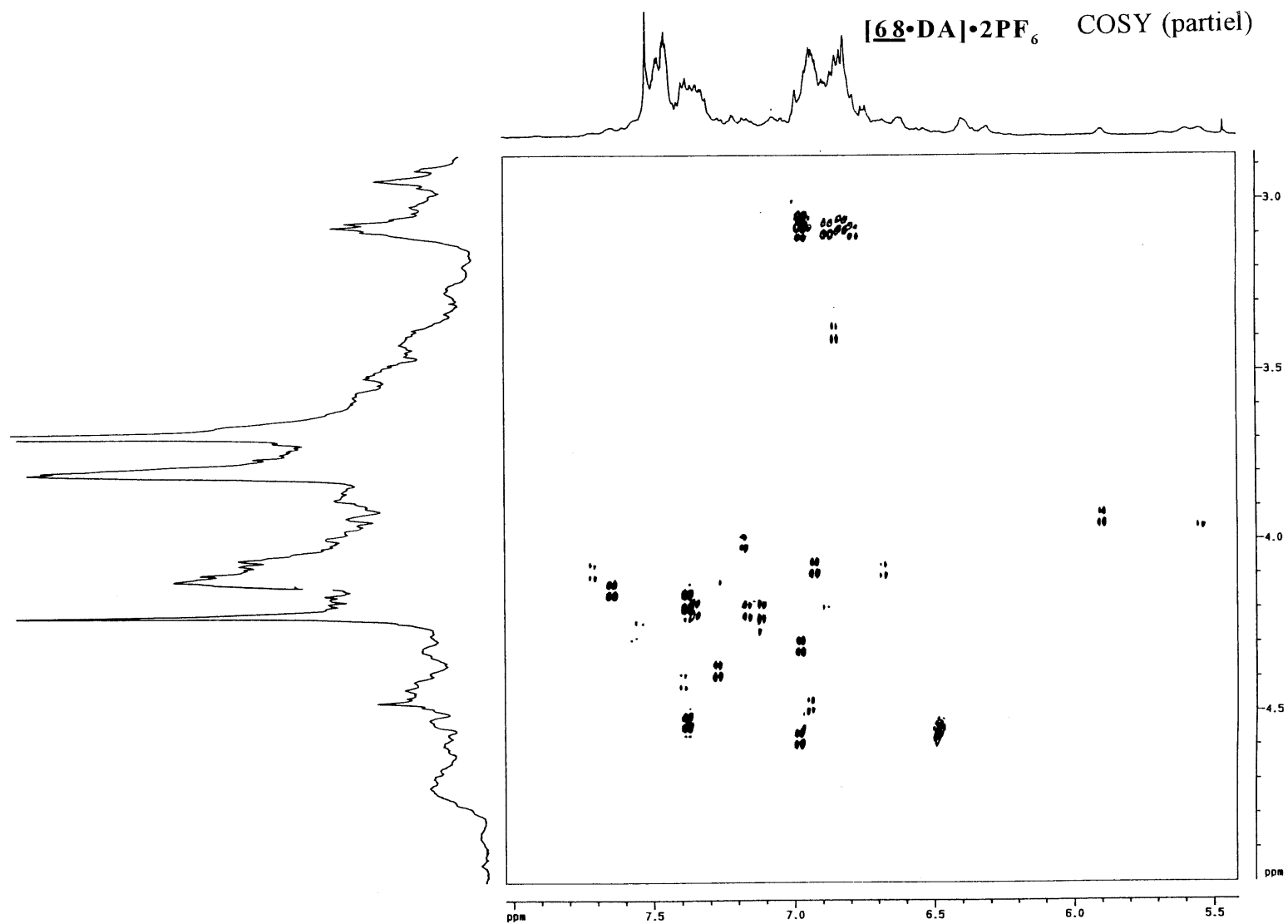


**68** TOCSY (partiel)

**68** TOCSY (partiel)

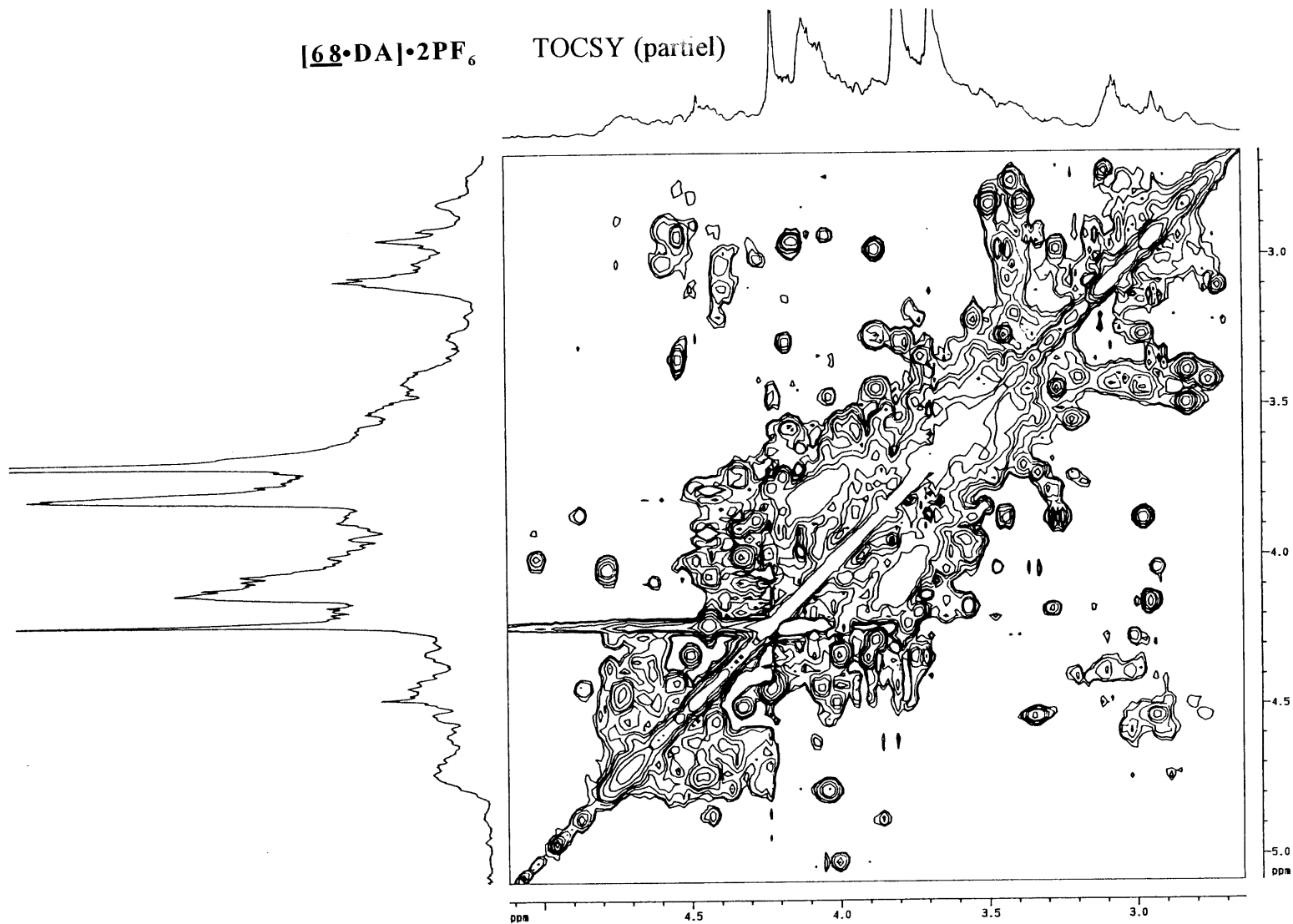






[68•DA]•2PF<sub>6</sub>

TOCSY (partiel)



## RÉFÉRENCES

1. P. LÄUGER, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 24, 905 (1985).
2. B. HILLE, Ionics Channels of Excitable Membranes 2nd edition, Sinauer, Sunderland (1992).
3. D. VOET et J. D. VOET, Biochemistry, John Wiley and Sons, New York (1990).
4. a) M. D. HOUSLAY et K. K. STANLEY, Dynamics of Biological Membranes, John Wiley and Sons, New York (1982); b) R. N. ROBERTSON, The Lively Membranes, Cambridge University Press, Cambridge (1983); c) G. SPACH, Physical Chemistry of Transmembranar Ion Motions, Elsevier, Amsterdam (1983).
5. G. BENGHA et U. V. MORARIU, Nature 265, 636 (1977).
6. J. H. WIDDICOMBE, M. J. WELSH et W. E. FINKBEINER, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6167 (1985).
7. J. D. LEAR, Z. R. WASSERMAN et W. F. DeGRADO, Science 240, 1177 (1988) et les références citées.
8. A. BRISSON et P. N. T. UNWIN, Nature 315, 474 (1985).

9. A. GROVE, M. MUTTER, J. E. RIVIER et M. MONTAL, J. Am. Chem. Soc. 115, 5919 (1993).

10. a) W. F. DeGRADO et J. D. LEAR, Biopolymers 29, 205 (1990); b) K. S. AKERFELDT, J. D. LEAR, Z. R. WASSERMAN, L. A. CHUNG et W. F. DeGRADO, Acc. Chem. Res. 26, 191 (1993).

11. M. M. SHEMYAKIN, Y. A. OVCHINNIKOV, V. T. IVANOV, V. V. ANTONOV, E. I. VINOGRADOVA, A. M. SHKROB, G. G. MALENKOV, A. V. ESTRATOV, I. A. LAINE, E. I. MELNIK et I. D. RYABOVA, J. Membr. Biol. 1, 402 (1969).

12. P. JUVVADI, S. VUNNAM et R. B. MERRIFIELD, J. Am. Chem. Soc. 118, 8989 (1996).

13. R. B. GENNIS, dans Biomembranes: Molecular Structure and Function, Springer-Verlag, New York (1988), p 286.

14. a) S. B. HLADKY et D. A. HAYDON, Nature 225, 451 (1970); b) D. W. URRY, T. L. TRAPANE et K. U. PRASAD, Science 221, 1064 (1983).

15. a) T. M. FYLES, D. HEBERLE, W. F. STRAATEN-NIJENHUIS et X. ZHOU, Supramol. Chem. 6, 71 (1995); b) T. M. FYLES, D. LOOCK, W. F. STRAATEN-NIJENHUIS et X. ZHOU, J. Org. Chem. 61, 8866 (1996).

16. a) E. STADLER, P. DEDEK, K. YAMASHITA et S. L. REGEN, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 6677 (1994); b) G. DENG, T. DEWA et S. L. REGEN, *ibid.* 118, 8975 (1996).
17. M. R. GHADIRI, J. R. GRANJA et L. K. BUEHLER, *Nature* 369, 301 (1994).
18. M. R. GHADIRI, J. R. GRANJA, R. A. MILLIGAN, D. E. McREE et N. KAZANOVICH, *Nature* 366, 324 (1993).
19. I. TABUSHI, Y. KURODA et K. YOKOTA, *Tetrahedron Lett.* 23, 4601 (1982).
20. Y. TANAKA, Y. KOBUEKE et M. SOKABE, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 34, 693 (1995).
21. a) O. MURILLO, S. WATANABE, A. NAKANO et G. W. GOKEL, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 7665 (1995); b) O. MURILLO, I. SUZUKI, E. ABEL, C. L. MURRAY, E. S. MEADOWS, T. JIN et G. W. GOKEL, *ibid.* 119, 5540 (1997); c) C. L. MURRAY, E. S. MEADOWS, O. MURILLO et G. W. GOKEL, *ibid.* 119, 7887 (1997).
22. L. A. WEISS, N. SAKAI, B. GHEBREMARIAM, C. NI et S. MATILE, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 12144 (1997).

23. a) L. JULLIEN et J.-M. LEHN, *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 12, 55 (1992); b) M. J. PREGEL, L. JULLIEN et J.-M. LEHN, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 31, 1637 (1992).
24. a) V. E. CARMICHAEL, P. J. DUTTON, T. M. FYLES, T. D. JAMES, J. A. SWAN et M. ZOJAJI, *J. Am. Chem. Soc.* 111, 767 (1989); b) T. M. FYLES, T. D. JAMES, A. PRYHITKA et M. ZOJAJI, *J. Org. Chem.* 58, 7456 (1993).
25. D. SEEBACH, A. BRUNNER, H. M. BÜRGER, R. N. REUSCH et L. L. BRAMBLE, *Helv. Chim. Acta* 79, 507 (1996).
26. a) U. KOERT, M. STEIN et K. HARMS, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 33, 1180 (1994); b) H. WAGNER, K. HARMS, U. KOERT, S. MEDER et G. BOHEIM, *ibid.* 35, 2643 (1996).
27. C. J. STANKOVIC et S. L. SCHREIBER, *Chemtracts Org. Chem.* 4, 1 (1991).
28. L. LIEN, D. C. J. JAIKARAN, Z. ZHANG et G. A. WOOLLEY, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12222 (1996).
29. J.-H. FUHRHOP, U. LIMAN et V. KOESLING, *J. Am. Chem. Soc.* 110, 6840 (1988).

30. F. M. MENDER, D. S. DAVIS, R. A. PERSICHETTI et J. J. LEE, J. Am. Chem. Soc. 112, 2451 (1990).
31. Y. KOBUE, K. UEDA et M. SOKABE, J. Am. Chem. Soc. 114, 7618 (1992).
32. G. W. GOKEL, J. C. MEDINA et C. LI, Synlett 677 (1991).
33. D. M. ENGLEMAN, T. A. STEITZ et A. GOLDMAN, Annu. Rev. Biophys. Chem. 15, 321 (1986).
34. P. Y. CHOU et G. D. FASMAN, Annu. Rev. Biochem. 47, 251 (1978).
35. B. G. COX et H. SCHNEIDER, dans Coordination and Transport Properties of Macrocyclic Compounds in Solution, Elsevier, Amsterdam (1992), chap. 5.
36. R. B. MERRIFIELD, dans Peptides: Synthesis, Structure and Applications, Academic Press, New York (1995), chap. 3.
37. a) S. N. BANERJEE et C. RESSLER, J. Org. Chem. 41, 3056 (1976); b) N. VOYER, J. Am. Chem. Soc. 113, 1818 (1991).
38. a) N. F. CURTIS, J. Chem. Soc. 4409 (1960); b) E. WEBER et F. VÖGTLE, Top. Curr. Chem. 98, 1 (1981).



39. a) W. F. DeGRADO et E. T. KAISER, J. Org. Chem. 45, 1295 (1980); b) *ibid.* 47, 3258 (1982).
40. J. M. STEWART et J. D. YOUNG, dans Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company (1984), p 105.
41. D. SEEBACH, A. THALER, D. BLASER et S. Y. KO, Helv. Chem. Acta 74, 1102 (1991).
42. A. PICHETTE, N. VOYER, R. LAROUCHE et J.-C. MEILLON, Tetrahedron Lett. 38, 1279 (1997).
43. H. BENZ, Synthesis 337 (1994).
44. a) G. ÖSAPAY et J. W. TAYLOR, J. Am. Chem. Soc. 112, 6046 (1990); b) H. MIHARA, J. A. CHMIELEWSKI et E. T. KAISER, J. Org. Chem. 58, 2209 (1993).
45. a) S. H. NAKAGAWA, H. S. H. LAU, F. J. KEZDY et E. T. KAISER, J. Am. Chem. Soc. 107, 7087 (1985); b) E. T. KAISER, H. MIHARA, G. A. LAFORET, J. W. KELLY, L. WALTERS, M. A. FINDEIS et T. SASAKI, Science 243, 187 (1989).

46. A. G. WALTON, dans *Polypeptides and Proteins Structure*, Elsevier, New York (1981).
47. M. C. MANNING, dans *Biocatalyst Design for Stability and Specificity*, American Chemical Society, Washington (1993), chap. 3.
48. R. W. WOODY, dans *Peptides, Polypeptides and Proteins*, John Wiley and Sons, New York (1974), pp 338-350.
49. C. T. CHANG, C.-S. C. WU et J. T. YANG, *Anal. Biochemistry* 13 (1978).
50. M. GOODMAN, F. CHEN, C. GILON, R. INGWALL, D. NISSEN et M. PALUMBO, dans *Peptides, Polypeptides and Proteins*, John Wiley and Sons, New York (1974), pp 126-145.
51. M. CASCIO et B. A. WALLACE, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 435, 527 (1984).
52. P. I. HARIS, D. C. LEE et D. CHAPMAN, *Biochim. Biophys. Acta* 255 (1986).
53. a) J. URRY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 1610 (1972); b) J. L. R. ARRONDO, A. MUGA, J. CASTRESANA et F. M. GONI, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 59, 23, (1993); c) E. A. J. MERCER, G. W. ABBOTT, S. P. BRAZIER, B. RAMESH, P. I. HARIS et S. K. S. SRAI, *Biochem. J.* 475 (1997).

54. a) W. Z. HE, W. R. NEWELL, P. I. HARIS, D. CHAPMAN et J. BARBER, *Biochemistry* 30, 4552 (1991); b) M. JACKSON et H. H. MANTSCH, *Biochim. Biophys. Acta* 231 (1991).
55. N. VOYER et M. ROBITAILLE, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 6599 (1995).
56. C. THOMAS, C. SAUTEREY, M. CASTAING, C. M. GARY-BOBO, J.-M. LEHN et P. PLUMERE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 981 (1983).
57. T. M. FYLES, T. D. JAMES et K. C. KAYE, *Can. J. Chem.* 68, 976 (1990).
58. G. A. WOOLLEY, A. S. I. JAIKARAN, Z. ZHANG et S. PENG, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 4448 (1995).
59. B. A. SUAREZ-ISLA, K. WAN, J. LINDSTROM et M. MONTAL, *Biochemistry* 22, 2319 (1983).
60. C. P. LAFRANCE, A. NABET, R. E. PRUD'HOMME et M. PEZOLET, *Can. J. Chem.* 73, 1497 (1995).
61. a) K. J. ROTHSCHILD et N. A. CLARK, *Biophys. J.* 25, 473 (1979); b) E. GOORMAGHTHIGH et J. M. RUYSSCHAERT, dans *Molecular Description of Biological Membranes by Computer Aided Conformational Analysis*, CRC Press, Boca Raton (1990), pp 285-329.

62. D. PHILP et J. F. STODDART, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 35, 1154 (1995).

63. a) A. R. LISS, *Self-Assembling Architecture*, J. E. Varner, New York (1988); b) J.-M. LEHN, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim (1995); c) G. M. WHITESIDES, J. P. MATHIAS et C. T. SETO, *Science* 254, 1312 (1991).

64. a) A. KLUG, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 22, 565 (1983); b) L. STRYER, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York (1988), p 852.

65. M. NOMURA, *Science* 179, 864 (1973).

66. a) C. J. PEDERSEN, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 27, 1009 (1988); b) J.-M. LEHN, *ibid.* 27, 89 (1988); c) D. J. CRAM, *ibid.* 27, 1021 (1988).

67. M. C. T. FYFE et J. F. STODDART, *Acc. Chem. Res.* 30, 393 (1997).

68. a) M. GALLANT, M. T. P. VIET et J. D. WUEST, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 721 (1991); b) M. SIMARD, D. SU et J. D. WUEST, *ibid.* 113, 4696 (1991); c) X. WANG, M. SIMARD et J. D. WUEST, *ibid.* 116, 12119 (1994).

69. a) C. T. SETO et G. M. WHITESIDES, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 712 (1991); b) J. A. JERKOWSKI, C. T. SETO et G. M. WHITESIDES, *ibid.*

114, 5473 (1992); c) J. C. MACDONALD et G. M. WHITESIDES, Chem. Rev. 94, 2383 (1994).

70. B. C. HAMANN, K. D. SHIMIZU et J. REBEK Jr., Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 35, 1326 (1996).

71. B. HASENKNOPF, J.-M. LEHN, B. O. KNEISEL, G. BAUM et D. FENSKE, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 35, 1838 (1996).

72. C. O. DIETRICH-BUCHECKER, J.-P. SAUVAGE et J.-M. KERN, J. Am. Chem. Soc. 106, 3043 (1984).

73. a) H. L. ANDERSON et J. K. M. SANDERS, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 29, 1400 (1990); b) C. J. WALTER et J. K. M. SANDERS, *ibid.* 34, 217 (1995).

74. A. TERFORT et G. von KIEDROWSKI, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 31, 654 (1992).

75. K. SEVERIN, D. H. LEE, J. A. MARTINEZ et M. R. GHADIRI, Chem. Eur. J. 3, 1017 (1997).

76. R. S. WYLIE et D. H. MACARTNEY, J. Am. Chem. Soc. 114, 3136 (1992).

77. P. N. W. BAXTER, H. SLEIMAN, J.-M. LEHN et K. RISSANEN, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 36, 1294 (1997).

78. P. E. MASON, I. W. PARSONS et M. S. TOLLEY, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 35, 2238 (1996).
79. M. ASAKAWA, P. R. ASHTON, G. R. BROWN, W. HAYES, S. MENZER, J. F. STODDART, A. J. P. WHITE et D. J. WILLIAMS, *Adv. Mater.* 8, 37 (1996).
80. P. R. ASHTON, E. J. T. CHRYSTAL, P. T. GLINK, S. MENZER, C. SCHIAVO, N. SPENCER, J. F. STODDART, P. A. TASKER, A. J. P. WHITE et D. J. WILLIAMS, *Chem. Eur. J.* 2, 709 (1996).
81. P. R. ASHTON, P. T. GLINK, J. F. STODDART, P. A. TASKER, A. J. P. WHITE et D. J. WILLIAMS, *Chem. Eur. J.* 2, 729 (1996).
82. M. BORN et H. RITTER, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 34, 310 (1995).
83. P.-L. ANELLI, N. SPENCER et J. F. STODDART, *J. Am. Chem. Soc.* 113, 5131 (1991).
84. M. ASAKAWA, P. R. ASHTON, R. BALLARDINI, V. BALZANI, M. BELOHRADSKY, M. T. GANDOLFI, O. KOCIAN, L. PRODI, F. M. RAYMO, J. F. STODDART et M. VENTURI, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 302 (1997).

85. D. ARMSPACH, P. R. ASHTON, C. P. MOORE, N. SPENCER, J. F. STODDART, T. J. WEAR et D. J. WILLIAMS, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 32, 854 (1993).

86. a) D. B. AMABILINO, P. R. ASHTON, A. S. REDER, N. SPENCER et J. F. STODDART, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 33, 433 (1994); b) *ibid.* 33, 1286 (1994).

87. a) D. A. LEIGH, A. MURPHY, J. P. SMART et A. M. Z. SLAWIN, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 36, 728 (1997); b) A. S. LANE, D. A. LEIGH et A. MURPHY, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 11092 (1997).

88. a) P. R. ASHTON, P. J. CAMPBELL, E. J. T. CHRYSTAL, P. T. GLINK, S. MENZER, D. PHILP, N. SPENCER, J. F. STODDART, P. A. TASKER et D. J. WILLIAMS, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 34, 1865 (1995); b) P. R. ASHTON, P. T. GLINK, M.-V. MARTINEZ-DIAZ, J. FRASER STODDART, A. J. P. WHITE et D. J. WILLIAMS, *ibid.* 35, 1930 (1996); c) P. R. ASHTON, M. C. T. FYFE, P. T. GLINK, S. MENZER, J. F. STODDART, A. J. P. WHITE et D. J. WILLIAMS, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 12514 (1997).

89. a) N. VOYER et B. GUERIN, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1253 (1992); b) N. VOYER et B. GUERIN, *Tetrahedron* 50, 989 (1994); c) N. VOYER, J. ROBY, D. DESCHÊNES et J. BERNIER, *Supramol. Chem.* 5, 61 (1995).

90. R. JÄGER et F. VÖGTLE, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 36, 930 (1997).

91. P. R. ASHTON, A. S. REDER, N. SPENCER et J. F. STODDART, J. Am. Chem. Soc. 115, 5286 (1993).

92. a) C. FOUQUEY, J.-M. LEHN et A.-M. LEVELUT, Adv. Mater. 2, 254 (1990); b) N. KHAZANOVICH, J. R. GRANJA, D. E. McREE, R. A. MILLIGAN et M. R. GHADIRI, J. Am. Chem. Soc. 116, 6011 (1994).

93. C. J. PEDERSEN, J. Am. Chem. Soc. 89, 7017 (1967).

94. a) J. C. METCALFE, J. F. STODDART et G. JONES, J. Am. Chem. Soc., 99, 8317 (1977); b) S. S. ABED-ALI, B. J. BRIDSON et R. ENGLAND, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1565 (1987); c) S. MISUMI, Top. Curr. Chem. 165, 163 (1993).

95. M. NEWCOMB, S. S. MOORE et D. J. CRAM, J. Am. Chem. Soc. 99, 6405 (1977).

96. S. GANGULY et H. W. GIBSON, Macromolecules 26, 2408 (1993).

97. P. R. ASHTON, E. J. T. CHRYSTAL, P. T. GLINK, S. MENZER, C. SCHIAVO, J. F. STODDART, P. A. TASKER et D. J. WILLIAMS, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 34, 1869 (1995).

98. P. R. ASHTON, R. BALLARDINI, V. BALZANI, M. GOMEZ-LOPEZ, S. E. LAWRENCE, M. V. MARTINEZ-DIAZ, M. MONTALTI, A.



PIERSANTI, L. PRODI, J. F. STODDART et D. J. WILLIAMS, J. Am. Chem. Soc. 119, 10641 (1997).

99. S. J. ROWAN, D. G. HAMILTON, P. A. BRADY et J. K. M. SANDERS, J. Am. Chem. Soc. 119, 2578 (1997).

100. R. E. GILLARD, F. M. RAYMO et J. F. STODDART, Chem. Eur. J. 3, 1933 (1997).

101. C. J. PEDERSEN et H. K. FRENDORFF, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 11, 16 (1972).

102. D. J. CRAM, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 25, 1039 (1986).

103. F. DIEDERICH, Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 27, 362 (1986).

104. J. W. H. SMETTS, H. C. VISSER, V. E. M. KAATS-RITCHERS et R. J. M. NOLTE, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 109, 147 (1990).

105. a) R. M. IZATT, K. PAWLAK, J. S. BRADSHAW et R. L. BRUENING, Chem. Rev. 91, 1721 (1991); b) *ibid.* 95, 2529 (1995).